

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 7 月 17 日 (17.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/057888 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/64, C12P 21/00, C12Q
1/02, A61K 48/00, A61P 35/00, 43/00菅原町 3-1-1004 Osaka (JP). 山村 倫子 (YAMA-
MURA, Hisako) [JP/JP]; 〒630-0247 奈良県 生駒市 光
陽台 151 Nara (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/13683

(22) 国際出願日: 2002 年 12 月 26 日 (26.12.2002)

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052
東京都 港区 赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 Tokyo
(JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): CA, US.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, SE, SI, SK, TR).(30) 優先権データ:
特願 2001-4021022001 年 12 月 28 日 (28.12.2001) JP
特願 2002-255395 2002 年 8 月 30 日 (30.08.2002) JP添付公開書類:
— 国際調査報告書(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市
本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高橋 克仁 (TAKA-
HASHI, Katsuhito) [JP/JP]; 〒563-0055 大阪府 池田市

(54) Title: CELL-SPECIFIC EXPRESSION/REPLICATION VECTOR

(54) 発明の名称: 細胞特異的発現複製ベクター

(57) **Abstract:** It is intended to provide a therapeutic method comprising constructing a cell-specific expression/replication vector usable in treating malignant tumor, etc. which is capable of expressing and replicating a gene in specific cells such as a malignant tumor without injuring normal cells (in particular, a vector capable of regulating the expression/replication at a desired point after the expression/replication) and transferring the vector into specific cells such as a malignant tumor *in vivo* followed by the expression thereof. The transcription initiation regulating domain of a human calponin gene which is cell-specifically expressed is acquired and ligated to the upstream of a viral replication-associated gene such as ICP4. Then a DNA encoding a protein such as an angiogenesis regulator or an apoptosis-associated factor is ligated to the viral replication-associated gene as described above via IRES, while a thymidine kinase gene in an intact state is integrated into a viral DNA. Thus a cell-specific expression/replication vector not acting on adult normal cells is constructed. The thus constructed vector is transfected into malignant tumor cells so as to selectively disrupt the malignant tumor cells.

[続葉有]





(57) 要約:

悪性腫瘍等の治療に用いるために、悪性腫瘍等の特定の細胞で特異的に遺伝子を発現しつつ複製し、かつ正常細胞には損傷を与えないような、細胞特異的発現複製ベクター、特にその発現複製後の所望の時期に発現複製を抑制することができるベクターを構築し、悪性腫瘍等の特定の生体細胞に導入し発現させて治療する方法などを提供するものである。細胞特異的に発現するヒトカルボニン遺伝子の転写開始制御領域を取得し、これを I C P 4 等のウイルスの複製関連遺伝子上流に連結し、前記ウイルスの複製関連遺伝子に I R E S を介して血管新生抑制因子やアポトーシス関連因子等のタンパク質をコードする DNA を連結し、チミジンキナーゼ遺伝子はインタクトな状態で残したものを、ウイルス DNA に組み込んで、成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを構築し、この構築したベクターを悪性腫瘍細胞に感染導入させ、悪性腫瘍細胞を選択的に破壊する。

明 細 書

細胞特異的発現複製ベクター

5 技術分野

本発明は、特定の細胞に特異的に遺伝子を発現させ自己複製する成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター、特にその発現複製後の所望の時期に発現複製を抑制することができる細胞特異的発現複製ベクター、更には前記ベクターを用いて、特定の生体細胞で遺伝子を発現する方法、あるいは特定の細胞を破壊する方法等に関し、詳しくは、

10 (1) 癌の遺伝子治療分野において、特定の癌細胞そのものあるいは腫瘍内新生血管の増殖平滑筋細胞を特異的に破壊するために、遺伝子の発現を細胞特異的に行い得る発現複製ベクターを作製し、正常細胞には傷害を与えることなく治療を可能とし、治療終了後、ベクター感染細胞を

15 完全に除去することができる安全性の高い細胞特異的発現複製ベクターの構築や、(2) 肺や肝臓などの線維症に対する遺伝子治療の分野において、増殖筋線維芽細胞を特異的に破壊するために、遺伝子の発現を細胞特異的に行い得る発現複製ベクターを作製し、正常細胞には傷害を与えることなく治療を可能とし、治療終了後、ベクター感染細胞を完全に除

20 去することができる安全性の高い細胞特異的発現複製ベクターの構築や、(3) ステント留置後や臓器移植後の血管狭窄や動脈硬化症、糖尿病性網膜症などの遺伝子治療分野において、増殖血管平滑筋細胞を特異的に破壊するために、遺伝子の発現を細胞特異的に行い得る発現複製ベクターを作製し、正常細胞には傷害を与えることなく治療を可能とし、治療

25 終了後、ベクター感染細胞を完全に除去することができる安全性の高い細胞特異的発現複製ベクターの構築や、(4) 糸球体腎炎の遺伝子治療の

分野において、増殖メサングウム細胞を特異的に破壊するために、遺伝子の発現を細胞特異的に行い得る発現複製ベクターを作製し、正常細胞には傷害を与えることなく治療を可能とし、治療終了後、ベクター感染細胞を完全に除去することができる安全性の高い細胞特異的発現複製ベクターの構築等に関する。

背景技術

- 正常細胞には影響を与えず、癌細胞のみを選択的に傷害することができる、副作用の少ない理想的な癌の治療法が近年求められている。その一つとして遺伝子治療法が挙げられるが、かかる治療法は癌細胞に導入する遺伝子の細胞選択性や発現プロモーターの活性、ウイルスペクターの感染導入法など、いろいろなレベルで癌細胞選択性を高めることが可能であり、将来の有望な治療法として注目されている。しかし、すべての癌細胞において治療遺伝子を導入できないという共通の問題がある。
- 一方、癌の免疫細胞療法も、正常組織にもわずかながら組織特異的分化抗原の発現が認められることから、正常細胞に対する副作用が問題となっている。また、突然変異に基づく癌抗原は、個々の癌にその変異が限られるという欠点をもっていることから、それを分子標的とした癌の免疫細胞療法として一般化するには適しているとはいえない。
- 最近、感染と複製によって次々と増殖細胞のみを選択的に傷害する複製可能型単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクターを用いた悪性脳腫瘍の遺伝子治療臨床研究が米国と英国で行われている（Gene Ther. 7, 859-866, 2000、Gene Ther. 7, 867-874, 2000）。複製可能型HSVベクターは、ウイルス複製に必須な Ribonucleotide reductase（RR）又は Thymidine kinase（TK）を欠失したベクターであり、これらの酵素は正常細胞では増殖時にのみ発現するが、腫瘍細胞では構成的に発現して

いる。そのため、このH S V ベクターは、正常細胞であれ腫瘍細胞であれ増殖の盛んな細胞に感染すると、細胞由来のR R やT K を利用して複製され細胞溶解活性を示す。一方、国内では動物実験で、前立腺癌や膵臓癌に対する複製可能型H S V ベクターの抗腫瘍効果が報告されている

5 (J. Surg. Oncol. 72, 136-141, 1999) が、これらも細胞選択性がなく、安全性が低い。従って、血液脳関門があり、循環血液中にベクターが拡散しない脳ではヒトの治療に用いることができたが、脳以外の臓器での治療には適さないという問題点があった。

上記のことから、H S V ベクターの傷害活性を標的細胞特異的にコントロールできれば、さらに有効で安全な治療法になると考えられている。これまでに、米国の Marluza らによって、アルブミンプロモーターを用いた肝腫瘍選択的な複製可能型H S V ベクターが報告されている (J. Virol. 71, 5124-5132, 1997)。しかし、かかるベクターを用いると肝細胞癌ではアルブミン遺伝子の発現が低下し、また正常な再生肝細胞をも
10 傷害することなどからヒトでの臨床応用には適さないと考えられている。その他、米国特許第 5 7 2 8 3 7 9 号明細書(「腫瘍あるいは細胞特異的単純ヘルペスウイルスの複製」)では、中皮腫に対する応用の可能性を述べているが、平滑筋肉腫や骨肉腫、消化管ストローマ腫瘍 (G I S T) などのヒトの肉腫全般、腫瘍血管、増殖性血管病変、増殖性糸球体腎炎、
15 肺、肝臓等の線維症あるいは悪性腫瘍の間質で増殖する筋線維芽細胞に対する治療への応用可能性の記述はなされていない。

肉腫の病因と病態に関する遺伝子解析により、一部の腫瘍で p 5 3 と R b の変異や融合遺伝子の存在が報告されているが、まだ広く治療に応用できる段階に至ってはいない。ヌードマウスを用いた動物実験で、
25 Milas らは複製能を持たないアデノウイルスベクターを用いて平滑筋肉腫細胞に p 5 3 遺伝子を導入し、腫瘍の増殖遅延効果があることを報告

している (Cancer Gene Ther. 7, 422-429, 2000)。その他、オステオカルシン遺伝子のプロモーターを用いて、自殺遺伝子であるチミジンキナーゼを骨肉種に導入発現させる方法が報告されている (Cancer Gene Ther. 5, 274-280, 1998) が、これは複製能を欠失したウイルスベクターを用いたものであり、遺伝子導入の効率が悪く、骨肉腫以外の肉腫には適用できない。特に、Milas らの報告では、本発明者らによる報告 (Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001) に記載されているのと同じ、ヒト平滑筋細胞株 SK-LMS-1 を用いた実験例を示しているが、上記報告において使用したウイルスベクターの粒子量の 100 ~ 1000 倍多くのウイルス粒子を使用し、効果は上記報告におけるものよりも劣っている。従って、Milas 5 10 15 20 25 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 10495 10500 10505 10510 10515 10520 10525 10530 10535 10540 10545 10550 10555 10560 10565 10570 10575 10580 10585 10590 10595 10600 10605 10610 10615 10620 10625 10630 10635 10640 10645 10650 10655 10660 10665 10670 10675 10680 10685 10690 10695 10700 10705 10710 10715 10720 10725 10730 10735 10740 10745 10750 10755 10760 10765 10770 10775 10780 10785 10790 10795 10800 10805 10810 10815 10820 10825 10830 10835 10840 10845 10850 10855 10860 10865 10870 10875 10880 10885 10890 10895 10900 10905 10910 10915 10920 10925 10930 10935 10940 10945 10950 10955 10960 10965 10970 10975 10980 10985 10990 10995 11000 11005 11010 11015 11020 11025 11030 11035 11040 11045 11050 11055 11060 11065 11070 11075 11080 11085 11090 11095 11100 11105 11110 11115 11120 11125 11130 11135 11140 11145 11150 11155 11160 11165 11170 11175 11180 11185 11190 11195 11200 11205 11210 11215 11220 11225 11230 11235 11240 11245 11250 11255 11260 11265 11270 11275 11280 11285 11290 11295 11300 11305 11310 11315 11320 11325 11330 11335 11340 11345 11350 11355 11360 11365 11370 11375 11380 11385 11390 11395 11400 11405 11410 11415 11420 11425 11430 11435 11440 11445 11450 11455 11460 11465 11470 11475 11480 11485 11490 11495 11500 11505 11510 11515 11520 11525 11530 11535 11540 11545 11550 11555 11560 11565 11570 11575 11580 11585 11590 11595 11600 11605 11610 11615 11620 11625 11630 11635 11640 11645 11650 11655 11660 11665 11670 11675 11680 11685 11690 11695 11700 11705 11710 11715 11720 11725 11730 11735 11740 11745 11750 11755 11760 11765 11770 11775 11780 11785 11790 11795 11800 11805 11810 11815 11820 11825 11830 11835 11840 11845 11850 11855 11860 11865 11870 11875 118

殖血管平滑筋細胞を標的にした細胞選択的治療剤は未だ知られていない。実際、平滑筋細胞の増殖と遊走を促進する血小板由来増殖因子受容体の拮抗剤が強力な腫瘍新生血管抑制作用をもつことが報告され (Cancer Res. 60, 4152-4160; 2000)、腫瘍血管新生を抑制するために血管平滑筋を攻撃することの重要性が推測されるが、この方法は細胞非選択的であり、副作用も予想される。

また、増殖性血管病変特に、ステント留置後や心臓移植後の血管狭窄に対しては、新生内膜の平滑筋増殖を抑制する種々の薬剤が試みられているが、いずれも狭窄の予防には成功していない。最近の遺伝子治療の試みとしては、複製能を欠くアデノウイルスベクターを用いて、カルボニンの相同遺伝子である $SM22\alpha$ のプロモーターの制御下に $LacZ$ 遺伝子をバルーン傷害後のラット頸動脈の平滑筋細胞に選択的に導入した Leiden らの報告がある (J. Clin. Invest. 100, 1006-1014, 1997)。しかし、この実験では $LacZ$ 遺伝子が導入されたのは、標的細胞である内膜の増殖平滑筋ではなく中膜の平滑筋で、導入効率も極めて低いものであった。また、Nabel らも複製能のないアデノウイルスベクターを用いて $SM22\alpha$ のプロモーターの制御下に $LacZ$ 遺伝子を CAT (chloramphenicol acetyltransferase) 遺伝子をブタの動脈に導入する実験を行ったが、内膜の平滑筋細胞の 2.2%、中膜平滑筋細胞の 0.56% に遺伝子発現が認められたにすぎなかった (Mol. Med. 6, 983-991, 2000)。一方、複製可能型 HSV ベクターを用いてバルーン傷害後のラット頸動脈に感染させた宮武らの報告 (Stroke 30, 2431-2439, 1999) では、ウイルスの複製は主に内膜の増殖平滑筋で観察され、複製可能型ウイルスベクターを用いることの有用性が推測されるが、このベクターは細胞非選択的であり、内皮細胞や外膜線維芽細胞の破壊などの副作用も予想される。その他にもデコイやアンチセンス DNA などのオリゴヌク

レオチドを血管に直接導入する方法も発表されているが、導入効率が低く、血管平滑筋増殖の十分な抑制効果は期待できない。

また、増殖性糸球体腎炎に対する最近の遺伝子治療の試みとしては、
T G F β 1 の阻害作用をもつデコリン (decorin) や T G F β 受容体と I
5 g G F c 領域のキメラ遺伝子、また NF κ B のデコイをリポソーム
ベクターを用いて腎糸球体に導入する方法が報告されている (Nature
Med. 2, 418-423, 1996; Kidney Int. 55, 465-475, 1999; Gene Ther. 7,
1326-1332, 2000) が、この方法は細胞非選択的であり、副作用も予想さ
れる。また、腎糸球体に選択的に遺伝子を導入するために、複製能を欠
10 くアデノウイルスベクターをポリスチレンの微小球 (microsphere) に結
合させてラットの大動脈に投与する方法が発表されている (Kidney Int.
58, 1500-1510, 2000) が、増殖性糸球体腎炎の原因となるメサングウム
細胞以外に血管内皮細胞にも導入遺伝子の発現が認められ、治療の標的
化は未だ不完全である。さらに、アデノウイルスは免疫原性が強く、そ
15 れ自体が糸球体腎炎の原因となる免疫反応を惹起する危険性も指摘され
ている (Kidney Int. 61, S85-S88, 1997)。

他方、本発明者らは、ヒト由来の肉腫の腫瘍細胞に平滑筋の分化マ
ーカーとされるカルポニン遺伝子が発現していることを見い出し、はじめ
て報告した (Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998、Sarcoma 3, 107-113,
20 1999、Intern. J. Cancer 82, 678-686, 1999)。その後、骨・軟部肉腫
に加えて消化管ストローマ腫瘍 (G I S T) や唾液腺肉腫、繊維肉腫、
悪性神経鞘腫など 20 種類近い間葉系細胞由来のヒト悪性腫瘍で、カル
ポニン遺伝子が異常発現していることが国内外で相次いで報告されてい
る。上記カルポニン (h 1 又は basic) は、X線結晶構造と、インビト
25 ロ及びインビボの機能解析により、アクチン分子の C 末端に結合して、
アクチン・ミオシンの滑り運動を抑制することが明らかにされている

(Biochem. Biophys. Res. Commun. 279, 150-157, 2000, J. Physiol. 529, 811-824, 2000)。カルボニン遺伝子は、成体では、平滑筋細胞に選択的に発現し、血管の分化のマーカーと考えられている (Physiol. Rev. 75, 487-517, 1995)。

- 5 また、上記米国特許第 5 7 2 8 3 7 9 号明細書や本発明者らによる報告 (Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001) においては、HSV のチミジンキナーゼ (Thymidine kinase) をコードする DNA を欠失している複製可能型ベクターについて記述されているが、チミジンキナーゼを欠失している HSV は、抗ヘルペスウイルス薬であるアシクロビル (aciclovir) や
- 10 ガンシクロビル (ganciclovir) に対する感受性がなく、これらベクターをヒトの治療に応用する場合には、予期せぬウイルス感染の拡大を防ぐという安全対策の面において問題がないとはいえなかった。

- その他、神経細胞での複製に関与する gamma 3 4 . 5 遺伝子を 2 コピーとも欠失し、L a c Z 遺伝子が Ribonucleotide reductase (I C P 6)
- 15 - l o c u s に挿入されている複製可能型 H S V - 1 ベクター G 2 0 7 (Nature Med. 1, 938-943, 1995) や、CMV プロモーター/エンハンサーによって発現する autofluorescent protein と cytosine deaminase を I C P 6 - l o c u s に相同組換え法で挿入した複製可能型 H S V - 1
- 20 ベクター H S V 1 y C D (Cancer Res. 61, 5447-5452, 2001) は知られていたが、ともに Ribonucleotide reductase が欠失する結果、増殖細胞でのみ複製可能であるが、細胞選択性をもたない。また、肺や肝臓などの線維症における増殖筋線維芽細胞を標的にして、選択的に破壊する治療法の報告はない。また、悪性腫瘍の間質で増殖する筋線維芽細胞を標的にした治療法もこれまで報告がない。

- 25 本発明の課題は、悪性腫瘍等の治療に用いるために、悪性腫瘍等の特定の細胞で特異的に遺伝子を発現しつつ複製し、かつ正常細胞には損傷

を与えないような、細胞特異的発現複製ベクター、特にその発現複製後の所望の時期に発現複製を抑制することができる細胞特異的発現複製ベクターを構築すること、更には、該ベクターを悪性腫瘍等の特定の生体細胞に導入し発現させて治療する方法などを提供することにある。

- 5 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、特定の腫瘍細胞や平滑筋細胞に特異的に発現するヒトカルボニン遺伝子の該細胞内における転写開始制御領域を取得し、ウイルス複製関連遺伝子の複製開始に必要な転写因子をコードする遺伝子上流に組み込んで、これをウイルスDNAの複製に必須の酵素であるTK遺伝子と置き換えることによって、悪性腫瘍細胞や腫瘍内新生血管の増殖平滑筋細胞等の特定の細胞
10 で該遺伝子を発現させ、ウイルス複製を誘導し得る成人正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを構築した。この構築した細胞特異的発現複製ベクターを悪性腫瘍組織に導入したところ、腫瘍細胞や腫瘍新生血管の増殖平滑筋を選択的に傷害することを報告している（Cancer
15 Res. 61, 3969-3977, 2001；特願2001-143999）。

- 上記本発明者らが報告したカルボニンプロモーターをもつ複製可能型HSV-1ベクター（Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001；特願2001-143999）や、前記米国のMartuzaらによる、アルブミンプロモーターを用いた肝腫瘍選択的な複製可能型HSV-1ベクター（J.
20 Virol. 71, 5124-5132, 1997；米国特許5728379）が、これまでに発表された細胞特異的に複製可能なHSV-1ベクターであるが、どちらもウイルス複製に必須の転写因子であるICP4をコードする遺伝子を2つとも欠失したHSV-1変異体ウイルスd120を親株とし、プロモーターの上流にLacZcDNAを、下流にICP4cDNAを
25 接続し、d120のチミジンキナーゼ（Thimidine kinase）遺伝子座（TK-l o c u s）に相同組み換えしたものである。したがって、ベクタ

一精製の過程で指標となるLacZ遺伝子の発現はTK遺伝子のプロモーターの制御下にある。

かかるチミジンキナーゼをコードするDNAを欠失している複製可能型HSV-1ベクターは、抗ヘルペスウイルス薬であるアシクロビル (aciclovir) やガンシクロビル (ganciclovir) に対する感受性が欠如している。したがって、ベクターを単クローンにまで精製する方法は、相同組み換え後のウイルス混合液をICP4cDNAを導入したVer
oE5細胞に感染させ、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β
-D-ガラクトピラノシド (X-gal) アガロースオーバーレイ法で
10 LacZ遺伝子の発現を示す青色の染色によって、複数、好ましくは少数のプラークを回収し、ガンシクロビル (ganciclovir) の存在下でVer
oE5細胞に再び感染させるというプラーク精製のサイクルを繰り返すことによって行われてきた。抗ヘルペスウイルス薬によってTK-1
ocusで組み換えが起こらなかったウイルスすなわちTK遺伝子をもつ
15 ウイルスを排除する方法は、当然のことながらTK遺伝子をもつ細胞特異的発現複製ベクターの精製には適用することができない。

また、X-galアガロースオーバーレイ法は、スクリーニングの初期段階では単一のプラークを回収することは不可能である。さらに、この方法ではアガロースをオーバーレイした時点で、細胞の分裂増殖が停
20 止するとともにウイルスの複製も停止する結果、それ以降はウイルス粒子の数が増加しない。この場合、リボヌクレオチド還元酵素 (Ribonucleotide reductase, RR) 遺伝子のプロモーターなどTK遺伝子のプロモーターより活性の強いプロモーターによって発現されるLacZ遺伝子をもつ複製可能型ベクターでは、ベクター自身の複製能が高くない場合、TK遺伝子のプロモーターによって発現されるLacZ
25 遺伝子をもつ複製可能型ベクターのものと同程度に青色に染色された細

胞 1 個あたりのウイルス数が少ない。そのため、次のスクリーニングに向けて複製能力のあるベクターを回収することが困難である。

さらに、細胞特異的発現複製ベクターとして、I C P 4 c D N A と I R E S (internal ribosomal entry site) の下流に挿入した任意の遺伝子 (5 蛍光を発する Green Fluorescent Protein を発現する c D N A を好適に例示することができる) を連結させると、上記任意の遺伝子を細胞特異的な転写開始制御領域の制御下に発現させ、この任意の遺伝子の発現と L a c Z 遺伝子の発現の両方を指標にしてスクリーニングすることが可能となり、目的の場所に相同組み換えが起こったウイルスベクター (10 をより確実にしかも迅速に単離することができる) の知見を得た。

また、相同組み換え後の最初のスクリーニングに、細胞特異的に発現する遺伝子のプロモーターすなわち転写開始制御領域が活性化され得る I C P 4 (-) 細胞又は該遺伝子を発現する I C P 4 (-) 細胞に、細胞特異的発現複製ベクターを含む相同組み換え後のウイルス混合液を感 (15 染させ、前記ウイルスを複製・増殖させた後、ベクター内に組み込んだ遺伝子の発現を指標にして、限界希釈法によって単一クローンにまで精製する方法を用いることによって、細胞特異的プロモーターの制御下に I C P 4 を発現するという目的の組み換えが起こったベクターを選別濃縮することができることを見い出した。さらに、チミジンキナーゼを温 (20 存した細胞特異的発現複製ベクターは、アシクロビル (aciclovir) やガンシクロビル (ganciclovir) によってその感染細胞とともにウイルスを死滅させることが可能であり、予期せぬウイルス感染の拡大を防ぐという安全対策の面で優れた特性を有している) の知見を得た。一方、チミジンキナーゼを欠失することを特徴とする細胞特異的複製可能型 H S V (25 - 1 ベクターである米国特許 5 7 2 8 3 7 9 号の発明および先に出願した特願 2 0 0 1 - 1 4 3 9 9 9 号の発明の実施例は、ヒトの治療への応

用には適さないとも考えられる。そして、細胞特異的発現複製ベクターが、実際にヒト軟部肉腫の中で最も頻度の高い悪性線維性組織球種 (Malignant Fibrous Histiocytoma; MFH) や、ヒト消化管肉腫の中で最も頻度の高い消化管ストローマ腫瘍 (Gastrointestinal stromal tumor; GIST) や、婦人科領域で最も頻度の高い子宮筋腫に対して治療効果をもつことをインビトロの細胞培養系または動物実験系で確認した。本発明は上記の知見に基づいて完成するに至ったものである。

発明の開示

- すなわち本発明は、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域を所定の遺伝子の upstream に組み込んだ成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターにおいて、前記細胞特異的発現複製ベクターに存在するチミジンキナーゼ (Thymidine kinase) 遺伝子を利用して所望の時期にその複製を抑制しうることを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター (請求項 1) や、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号 1 に示される塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 1 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター (請求項 2) や、配列番号 1 に示される塩基配列を含む領域が、配列番号 2 に示される塩基配列からなるヒトカルボニン遺伝子プロモーターを含む領域であることを特徴とする請求項 2 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター (請求項 3) や、配列番号 2 に示される塩基配列を含む領域が、配列番号 3 に示される塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 3 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター (請求項 4) や、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号 1、配列番号 2 又は配列番号 3 に示される塩基配列において、1 若しくは数個の塩基が

- 欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 1 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 5）や、転写開始制御領域の上流にエンハンサーが組み込まれていることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 6）や、エンハンサーが 4 F 2 エンハンサーであることを特徴する請求項 6 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 7）や、所定の遺伝子のさらに下流に、所定の遺伝子とは異なる目的タンパク質をコードする DNA が連結され、前記転写開始制御領域の制御下に目的タンパク質を発現することを特徴とする請求項 1 ～ 7 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 8）や、目的タンパク質をコードする DNA が、IRES (internal ribosomal entry site) を介して所定の遺伝子に連結されていることを特徴する請求項 8 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 9）や、目的タンパク質をコードする DNA が、アポトーシスの促進に関連する遺伝子であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 10）や、目的タンパク質をコードする DNA が、血管新生抑制作用をもつタンパク質をコードする DNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 11）や、目的タンパク質をコードする DNA が、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードする DNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 12）や、目的タンパク質をコードする DNA が、癌抑制作用をもつタンパク質をコードする DNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のい

れか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 13）や、所定の遺伝子が、ウイルス複製関連遺伝子であることを特徴する請求項 1～13 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 14）や、ウイルス複製関連遺伝子が、ICP4 又は E1A であることを特徴する請求項 14 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 15）や、発現複製ベクターが、ウイルスベクターであることを特徴とする請求項 1～15 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 16）や、ウイルスベクターが、単純ヘルペスウイルスベクター（HSV ベクター）又はアデノウイルスベクターであることを特徴とする請求項 16 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 17）や、腫瘍細胞特異的、腫瘍新生血管の増殖平滑筋特異的、増殖性血管病変における増殖平滑筋特異的、糸球体腎炎における増殖メサンギウム細胞特異的、又は線維症における増殖筋線維芽細胞特異的な発現複製ベクターであることを特徴とする請求項 1～15 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 18）や、リボヌクレオチドリダクターゼ(Ribonucleotide reductase)をコードする DNA をコードする DNA を欠失していることを特徴とする請求項 1～18 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター（請求項 19）に関する。

また本発明は、請求項 1～19 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させることを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製方法（請求項 20）や、請求項 1～19 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製

させ、その後の所望の時期に、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制することを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法（請求項 2 1）や、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製の抑制が、

- 5 アシクロビル（aciclovir）、ガンシクロビル（ganciclovir）等の抗ウイルス薬を用いることによる抑制であることを特徴とする請求項 2 1 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法（請求項 2 2）や、請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させて前記細胞特異的発現複製ベクターによるチミジンキナーゼ活性を測定することを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法（請求項 2 3）や、チミジンキナーゼ活性の測定が、¹²⁴I でラベルしたウラシル誘導体 F I A U を用いる Positron
- 10 Emission Tomography による測定であることを特徴とする請求項 2 3 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法（請求項 2 4）に関する。

- さらに本発明は、生体細胞組織が、腫瘍組織、動脈狭窄組織、腎炎組織又は線維症組織であることを特徴とする請求項 2 0 ～ 2 4 のいずれか
- 20 記載の方法（請求項 2 5）や、請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを含むことを特徴とする治療薬（請求項 2 6）や、悪性腫瘍、線維症、増殖性血管病変又は増殖性糸球体腎炎に対する治療薬であることを特徴とする請求項 2 6 記載の治療薬（請求項 2 7）や、悪性線維性組織球種、消化管ストローマ
- 25 腫瘍又は子宮筋腫に対する治療薬であることを特徴とする請求項 2 7 記載の治療薬（請求項 2 8）や、請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の成体正

- 常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、肺、肝臓などの線維症組織または乳がん、胃がん、膵臓がんなどの悪性腫瘍組織に導入し、遺伝子、蛋白およびペプチドを発現させ、増殖筋線維芽細胞を選択的に破壊することを特徴とする線維症及び悪性腫瘍の治療方法(請求項 29)
- 5 や、悪性線維性組織球種、消化管ストローマ腫瘍又は子宮筋腫を対象とすることを特徴とする請求項 29 記載の線維症及び悪性腫瘍の治療方法(請求項 30) や、請求項 1～19 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、血管狭窄組織または動脈硬化組織、糖尿病性網膜症組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチド
- 10 を発現させ、増殖平滑筋細胞又は血管周細胞を選択的に破壊することを特徴とする増殖性血管病変の治療方法(請求項 31) や、請求項 1～19 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腎炎組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させ、増殖メサンギウム細胞を選択的に破壊することを特徴とする増殖性
- 15 糸球体腎炎の治療方法(請求項 32) や、細胞特異的発現複製ベクターを、静脈又は動脈に投与することを特徴とする請求項 29～32 のいずれか記載の治療方法(請求項 33) や、所望の時期に、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制することを特徴とする請求項 29～33 のいずれか記載の治療方法(請求項 34) や、細胞特異的に発現する遺
- 20 伝子の転写開始制御領域が活性化され得る細胞又は該遺伝子を発現する細胞に、請求項 1～19 のいずれか記載の細胞特異的発現複製ベクターを含む相同組み換え後のウイルス混合液を感染させ、ベクター内に組み込んだ遺伝子の発現を指標にして、限界希釈法によって単一クローンにまで精製することを特徴とする細胞特異的発現複製ベクターの製造方法
- 25 (請求項 35) や、細胞が、ICP4(+)細胞であることを特徴とする請求項 35 記載の細胞特異的発現複製ベクターの製造方法(請求項 3

6) に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、d12・CALP Δ RR作成の手順とその構造を示す写真
5 である。左は、pKpX2 (ICP6のXhoI断片) とICP6のS
tuI-XhoI断片をDIG標識プローブにしたサザンブロットの結果
を示す。d120は相同組み換えを行った親株で、2つのICP4遺
伝子とともに欠失したKOS株由来の変異体である。hrR3は、野性
10 型であるKOS株のRibonucleotide reductase (ICP6) 遺伝子のB
amHIサイトにLacZ遺伝子が挿入され(pKX2 β G3)、結果と
してICP6を欠失している。

第2図は、インビトロでのカルボニン陽性悪性腫瘍細胞 (SK-LMS-1 平滑筋肉腫) に対するd12・CALP Δ RRの選択的細胞傷害
15 活性を示す写真である。左上は、RT-PCRでカルボニンmRNAの
発現をみたもので、OST骨肉腫細胞では、カルボニンはほとんど発現
していない。右はプラークのX-Gal染色である。

第3図は、インビトロでのカルボニン陽性悪性腫瘍細胞 (SK-LMS-1 平滑筋肉腫) におけるd12・CALP Δ RRの複製をLacZ遺伝
子の発現を示すX-Gal染色で示し、カルボニンプロモーターの制御
20 下に発現するEGFP蛋白を蛍光顕微鏡で観察した写真である。LacZと
EGFPが共に発現している細胞を多数観察することができる。

第4図は、インビトロでのカルボニン陽性悪性腫瘍細胞 (SK-LMS-1 平滑筋肉腫) およびICP4 cDNAを導入したVer o E5細胞
25 におけるd12・CALP Δ RRの複製と細胞傷害活性のガンシクロ
ビル (ganciclovir) 感受性を示す写真である。左はガンシクロビル
(ganciclovir) 高感受性のhrR3と比較したものであり、右は、チミジ

ンキナーゼを欠失する d 1 2・C A L P (特願 2 0 0 1-1 4 3 9 9 9) と比較したもので、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のガンシクロビル(ganciclovir)存在下で細胞傷害活性をみたものである。d 1 2・C A L P はガンシクロビル(ganciclovir)に感受性がない。

5 第 5 図は、カルボニン m R N A の発現及びインビトロでの細胞崩壊分析及びベクター複製分析を示す写真である。a は、ヒト肉腫（悪性線維性組織球腫）におけるカルボニン (h 1) m R N A の発現を示す。b は、腫瘍に対して d 1 2・C A L P Δ R R ベクター 0. 0 1 M O I を感染させたときのブランクの X-G a l 染色である。

10 第 6 図は、インビトロでの細胞崩壊分析及びベクター複製分析を示す写真である。a は G I S T 細胞に対して 0. 0 1 M O I の、b は、G I S T 細胞に対して 0. 1 M O I の、c は、子宮筋腫培養細胞に対して 0. 0 1 M O I の、d は、子宮筋腫培養細胞に対して 0. 1 M O I の、d 1 2・C A L P Δ R R ベクターをそれぞれ感染させたときのブランクの X
15 -G a l 染色である。

第 7 図は、インビボでの皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果を示すグラフである。

第 8 図は、インビボでの肺転移腫瘍における d 1 2・C A L P Δ R R ベクターの 1 回静脈内投与における複製の分析及び抗腫瘍効果を示す写真である。
20

第 9 図は、インビボでの d 1 2・C A L P Δ R R ベクターの 3 回静脈内投与によるヒト肺転移腫瘍の治療効果を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

25 本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターとしては、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域を所定の遺伝子

の上流に組み込んだ成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターにおいて、前記細胞特異的発現複製ベクターに存在するチミジンキナーゼ (Thymidine kinase) 遺伝子を利用して所望の時期にその複製を抑制しうるベクターであれば特に制限されるものではないが、腫瘍細胞

5 特異的、腫瘍新生血管の増殖平滑筋特異的、増殖性血管病変における増殖平滑筋特異的、糸球体腎炎における増殖メサンギウム細胞特異的、又は線維症における増殖筋線維芽細胞特異的な発現複製ベクターが好ましく、上記細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域としては、細胞特異的に発現している遺伝子のプロモーター領域や該プロモーターの

10 一部の領域を挙げることができ、より具体的には、カルボニン遺伝子のプロモーターの-260から-219までの配列番号1に示される塩基配列を含む領域、好ましくは配列番号2に示される塩基配列からなるヒトカルボニン遺伝子プロモーター、より好ましくは配列番号3に示される塩基配列からなるヒトカルボニン遺伝子プロモーターとその構造遺伝

15 子の一部を含む領域を例示することができる。また、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域として、上記配列番号1、配列番号2又は配列番号3に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写開始制御活性を有する塩基配列、例えばマウス、ラット及びブタ由来のカルボニンプロ

20 モーターのそれに相同な領域を含む領域を例示することができる。

上記の他、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域として、増殖平滑筋細胞を攻撃の標的にする場合は、SM22 α 遺伝子のプロモーター領域 (ヒトSM22 α 遺伝子では-480から-26までの配列; GenBank accession# D84342-D84344、マウスやラットあるいはその

25 他の哺乳動物由来のSM22 α 遺伝子ではそれに相同な領域)、内皮細胞を標的にする場合は、F1k-1のプロモーター領域又はF1t-1遺伝

子など内皮細胞特異的遺伝子のプロモーター領域を用いることができる。これらの場合にも、一部構造遺伝子を含む領域を転写開始制御領域とすることもできる。

上記細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域の上流に、転写を著しく活性化するエンハンサーを連結することが好ましく、かかるエンハンサーとしてはアデノウイルス初期遺伝子のエンハンサー、モロニー Maus 白血病ウイルス末端反復配列のエンハンサー、ヒストン H 2 A 遺伝子エンハンサー、免疫グロブリンエンハンサー、インスリン遺伝子エンハンサー、c-fos 遺伝子エンハンサー、T細胞抗原受容体遺伝子エンハンサー、筋型クレアチンキナーゼ遺伝子エンハンサー、ヒト 4 F 2 重鎖（ヘビーチェーン）転写エンハンサー等のエンハンサーであれば特に制限されないが、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、カルポニン遺伝子のプロモーターの - 2 6 0 から + 7 3 までの配列を含む領域の場合、アミノ酸トランスポーターの活性化因子であると考えられている膜貫通構造を一回しか持たない二型膜糖タンパク質である 4 F 2 ヘビーチェーン遺伝子のエンハンサーであるヒト 4 F 2 重鎖転写エンハンサー（配列番号 4）等の 4 F 2 エンハンサーが転写効率を著しく高めうる点で好ましい。

本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの作製に用いられる所定の遺伝子としては、ウイルスの複製の開始又は維持に必要な遺伝子であれば特に制限されるものではなく、例えば、アデノウイルスの E 1 A 遺伝子、I C P 6（Ribonucleotide reductase）遺伝子などのウイルス複製関連遺伝子を挙げることができ、中でもヘルペスウイルスの複製開始に必要な転写因子をコードする遺伝子（I C P 4）を好適に例示することができる。また、これら遺伝子は、転写開始制御領域の下流に位置する本来の構造遺伝子の一部又は全部と上記所定の遺

伝子がインフレームで結合したもののでもよく、例えば、カルボニン蛋白質のN末側の一部とICP 4蛋白質との融合タンパク質をコードするDNAを具体的に挙げるができる。

5 本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターとして、所定の遺伝子のさらに下流に、所定の遺伝子とは異なる目的タンパク質をコードするDNAが連結され、前記転写開始制御領域の制御下に目的タンパク質を発現することができる細胞特異的発現複製ベクター、
10 具体的には、上記目的タンパク質をコードするDNAが、IRES (internal ribosomal entry site; 米国特許第4937190号明細書) を介して所定の遺伝子に連結されている細胞特異的発現複製ベクターを好適に挙げるができる。このIRES部分にカルボニンのホモログであるSM22 α 遺伝子のプロモーターを連結することもできる。かかるヒトSM22 α プロモーター配列は本発明者らが最初にクローニングし、報告しており(J. Biochem. (Tokyo) 122, 157-167, 1997)、プロモ
15 ーター活性に重要な部分(ヒトSM22 α プロモーター領域のBamHI-DraI断片445bp)の塩基配列を配列番号5としてしめす。その他、IRESに代えて、CMVプロモーターやCAGプロモーターエンハンサーを用いると、カルボニンのプロモーターの制御から外れ、細胞非選択的に下流の目的タンパク質をコードする遺伝子を発現させる
20 ことができる。

上記目的タンパク質をコードするDNAとしては、アポトーシスの促進に関連する遺伝子や、血管新生抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAや、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAや、癌抑制作用をもつタンパク質をコードするDNA等を挙げることができ、
25 これらは2以上連結してもよい。上記アポトーシスの促進に関連する遺伝子としては、Bcl-x_s、Bok/Mtd、Bcl-Gs/Bra、

Bcl-GL、Bcl-Rambo、Hrk/DP5、Bik/Nbk
/Bik、Bad、Bid、BimL、S、EL/BodL、M、S、
Noxa/APR、Puma等のアポトーシス促進遺伝子を、血管新生
抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAとしては、アンジオスタ
チン、エンドスタチン、可溶性Flk-1、可溶性Flt-1、可溶性FLT4、
Tie1、Tie2などのドミナントネガティブ受容体タンパク質をコ
ードするDNAを、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードするDN
Aとしては、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）阻害剤、ウシ
ラクトフェリン（bLF）などのタンパク質をコードするDNAを、癌
抑制作用をもつタンパク質をコードするDNAとしては、p21、p1
6、p15等の細胞周期抑制物質や、p53、Rb、IRF-1、AP
C等の細胞増殖抑制物質をコードするDNAを、それぞれ具体的に例示
することができるがこれらに限定されるものではない。

上記目的タンパク質をコードするDNAとして、EGFPcDNAや、
ルシフェラーゼ（Luciferase）遺伝子等のマーカータンパク質をコード
する遺伝子を挙げることができ、これらマーカータンパク質を発現する
ことができる細胞特異的発現複製ベクターは、スクリーニングや各種実
験等においてきわめて有用である。

本発明の成体では正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター
の作製に用いられるウイルスベクターの骨格としては、骨・軟部肉腫、
平滑筋肉腫、消化管ストローマ腫瘍（GIST）、悪性中皮腫、悪性繊維
性組織球腫（MFH）、繊維肉腫、悪性髄膜腫、子宮筋腫、神経鞘腫等の
腫瘍細胞又は腫瘍新生血管の増殖平滑筋あるいは血管周細胞に感染又は
遺伝子を導入し発現することができるベクターが好ましく、かかるベク
ターとしては、染色体、エピソーム、リポソーム及びウイルスに由来す
る発現ベクターを例示することができるが、SV40のようなパポバウ

イルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスベクター、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、単純ヘルペスウイルスベクター（HSVベクター）等のウイルスベクターが好ましく、中でも、HSVベクターとアデノウイルスベクター、特に条件付き複製可能型HSVベクター、又は条件付き複製可能型アデノウイルスベクターが、遺伝子発現の高効率性、増殖細胞特異的細胞傷害活性などの点で好ましい。上記条件付き複製可能型HSVベクターとして、例えば、リボヌクレオチドリダクターゼ（Ribonucleotide reductase）をコードするDNAが欠失しているベクターを用いることにより、本発明の成体正常細胞に作用せず、ベクターの複製と遺伝子の発現を制御できる細胞特異的発現複製ベクターを好適に作製することができる。

本発明の成体では正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの発現複製方法としては、前記の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織、好ましくは骨・軟部肉腫、平滑筋肉腫、消化管ストローマ腫瘍、悪性中皮腫、悪性繊維性組織球腫、繊維肉腫、悪性髄膜腫、神経鞘腫等の腫瘍が生じている組織の他、ステント留置後や臓器移植後の血管狭窄組織若しくは動脈狭窄組織、腎炎組織又は線維症組織、又はこれら組織を含む器官に直接導入又は腫瘍を養う血管系から注入、又は血管内にステント等を用いて直接注入し発現複製させる方法、又は腫瘍新生血管の増殖平滑筋を攻撃の標的とする場合は、悪性固形腫瘍の種類がいかなるものであれ、直接導入又は腫瘍を養う血管系から注入し、発現複製させる方法であれば、特に制限されるものではない。また、本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法としては、前記の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、

- 上記生体細胞組織に導入して発現複製させ、その後の所望の時期に、例えば、アシクロビル (aciclovir)、ガンシクロビル (ganciclovir) 等の抗ウイルス薬を用いて、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制する方法であれば、特に制限されるものでない。そしてまた、本発明の
- 5 治療薬としては、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを有効成分として含むものであればどのようなものでもよく、かかる治療薬としては生体細胞組織、好ましくは上記悪性腫瘍、線維症、増殖性血管病変、増殖性糸球体腎炎等に対する治療薬を具体的に例示することができる。
- 10 本発明の線維症及び悪性腫瘍の治療方法としては、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、肺、肝臓などの線維症組織又は乳がん、胃がん、膵臓がんなどの悪性腫瘍組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させる方法であれば特に制限されず、なかでも、増殖筋線維芽細胞だけを選択的に破壊する方法や、腫
- 15 瘍新生血管の増殖平滑筋又は血管周細胞だけを選択的に破壊する方法が好ましい。悪性腫瘍が生じている組織に導入する方法としては、悪性腫瘍に上記細胞特異的発現複製ベクターを直接注入する方法又は動静脈投与等の腫瘍を灌流する血管系に注入する方法を好適に例示することができる。本発明の増殖性血管病変の治療方法としては、前記本発明の成体
- 20 正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、血管狭窄組織又は動脈硬化組織、糖尿病性網膜症組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させる方法であれば特に制限されず、なかでも、増殖平滑筋細胞又は血管周細胞だけを選択的に破壊する方法を好適に例示することができる。また、本発明の増殖性糸球体腎炎の治療方法としては、
- 25 前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腎炎組織に導入し、遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させる方法

であれば特に制限されず、なかでも、増殖メサンギウム細胞だけを選択的に破壊する方法を好適に例示することができる。そして、本発明の上記治療方法においては、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を、治療終了後等の所望の時期に、抑制することを大きな特徴としている。

- 5 本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法としては、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させて前記細胞特異的発現複製ベクターによるチミジンキナーゼ活性を検出・測定することを特徴とし、具体的には、 ^{124}I でラベルしたウラシル誘導体 F I A U を生体に投与し、Positron Emission Tomography により ^{124}I を検出・測定することにより、細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出することができる (Nature Med. 7, 859-863, 2001)。
- 10

- 本発明の細胞特異的発現複製ベクターの製造方法としては、細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が活性化され得る細胞又は該遺伝子を発現する細胞、好ましくは I C P 4 (－) 細胞に、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを含む相同組み換え後のウイルス混合液を感染させ、ベクター内に組み込んだ遺伝子の発現を指標にして、限界希釈法によって単一クローンにまで精製するスクリーニング方法であれば特に制限されるものではなく、かかるスクリーニングによる本発明の細胞特異的発現複製ベクターの製造方法の確立により、前記本発明の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターをはじめて得ることができる。
- 15
- 20

以下に、実施例を掲げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

25 実施例 A [方法と材料]

A-1 (細胞、培養方法、抗体、及びウイルス)

ヒト平滑筋肉腫細胞株SK-LMS-1 (HTB-88)、及びペロ細胞 (CCL-81) は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Cululture Collection) から購入した。ヒト骨肉腫細胞株OST (RCB0454) は、理研ジーンバンク (RIKEN GENE BANK) から購入した。ICP4遺伝子を導入したペロ細胞、E5細胞は、N. Deluca (University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh) から供与されたものを用いた。ヒト悪性線維性組織球種細胞株 (MFH-A1) は、神奈川県立がんセンターの矢野間博士より供与されたものを用いた。ヒト消化管ストローマ腫瘍 (GIST) 細胞とヒト子宮筋腫細胞は、カルポニン蛋白を発現していることを免疫組織化学によって確認した手術標本から腫瘍塊を無菌的に摘出し、コラゲナーゼ (1 mg/ml; Sigma Cat. # C-9722) 溶液で処理し、初代培養細胞を分離し、ベクターの感染実験にはRPMI 1640培地で3~4世代継代培養したものを用いた。SK-LMS-1は1 mMのピルビン酸ナトリウムを添加したイーグルMEMで培養した。OST、ペロ及びE5細胞は、DMEMで培養した。MFH-A1はRPMI 1640培地で培養した。全ての培地には、最終濃度で10%の熱不活性化ウシ胎仔血清 (Upstate Biotechnologies)、2 mMのL-グルタミン、100 unit/mLのペニシリン、及び100 µg/mLのストレプトマイシンがそれぞれ含まれている。また、上記全ての細胞は、加湿された5%のCO₂条件下で37℃にて培養した。

上記MFH-A1細胞を、6週齢の雌の無胸腺症ヌードマウス (BALB/c Slc-nu/nu) (日本SLC社製) の体側部に皮下注射して、腫瘍を定着させた。2ヶ月後に解剖し、肺に転移した腫瘍塊を無菌的に摘出し、コラゲナーゼ (1 mg/ml; Sigma Cat. # C-9722) 溶液で処理し、細胞を分離した。この細胞1×10⁶個を6週齢雌の無胸

腺症ヌードマウスの尾静脈から注入した。1ヶ月後再び肺に転移した腫瘍塊から前回と同様の方法で個々の腫瘍細胞を分離した。この操作をさらにもう1回繰り返し、ヒト悪性線維性組織球種MFH-AI細胞の高肺転移性の細胞株MFH-AI-LM細胞を分離した。

- 5 HSV-1又はHSV-2のICP4タンパク質に対するモノクローナル抗体(clone No.1101)は、Goodwin Institute for Cancer Researchのものをを用いた。イムノブロット分析は、文献(Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998)記載の方法と同様に行った。化学ルミネッセンス(ELISA; Amersham Pharmacia Biotech社製)は、製造者のプロトコルに従って結合抗体を視覚化した。また、それぞれICP4導入Vero E5細胞又はベロ細胞に低多重度で感染させることにより生成した、HSVのICP4欠損変異体d120(J. Virol. 56, 558-570, 1985)及びHSVのICP6(ribonucleotide reductase)欠損変異体hrR3は、N. Deluca又はS. Weller博士(University of Connecticut Health Center, Farmington)からそれぞれ供与されたものをを用いた。
- 10
- 15

A-2 (RNAの調製とRT-PCR分析)

- 全RNAはIsogene RNA extraction kit (Nippon Gene社製)を用いて培養した細胞又は組織からそれぞれ抽出し、文献(Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998)記載の半定量的RT-PCR分析を行った。PCR増幅の条件としては、94℃で40秒間変性させ、60℃で30秒間アニーリングし、72℃で90秒間伸長反応させるというサイクルを30回繰り返し行った。ヒトカルボニンプライマーとしては、5'-gagtgtgcagacggaacttcagcc-3' [フォーワードプライマー1 (FP1); nt# 10-33 GenBank D17408; 配列番号6]と5'-gtctgtgcccagcttggggtc-3' [リバープライマー1 (RP1); nt# 660-680; 配列番号7]を、コントロールとしてのGAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate
- 20
- 25

dehydrogenase) のプライマーとしては、5'-cccatcaccatcttccagga-3' [フォワードプライマー 2 (F P 2); nt# 342-360; 配列番号 8] と 5'-ttgtcataccaggaaatgagc-3' [リバープライマー 2 (R P 2); nt# 1052-1070; 配列番号 9] を用いて、それぞれ 671 bp と 731 bp の DNA を増幅させた。

A-3 (ヒトカルボニンプロモーターの単離)

文献 (J. Biochem. 120, 18-21, 1996) 記載の方法に従い、ヒトゲノム λ EMBL 3 ファージライブラリーのスクリーニングを行って、ヒトカルボニン遺伝子の 5' 上流側を含むゲノムクローンを単離した。5' 側が欠失した断片である p-1159 Luc、p-385 Luc、p-343 Luc、p-310 Luc、p-299 Luc、p-288 Luc、p-260 Luc、p-239 Luc、p-219 Luc、p-201 Luc、p-176 Luc、p-153 Luc をゲノムクローンを鋳型にして PCR 法で増幅することにより作製した。番号は、以後 +1 と表示される ATG 翻訳開始コドンの上流に位置する DNA 断片の 5' 末端を示している。欠失したこれらの断片は +73 の位置に共通の 3' 末端を有している。DQS-2000L DNA sequencer (SHIMADZU 社製) を製造者のプロトコールに従って使用し、該クローン断片のヌクレオチド配列を決定し、その配列は文献 (J. Biochem. 120, 18-21, 1996) に記載の配列 (DDBJ/GenBankTM/ EMBL database; accession No. D85611) と同一であることを確認した。文献 (Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001) に記載の方法によって、最小の発現調節領域 (-260 ~ +73) を同定した。

A-4 (トランスフェクション及びルシフェラーゼ分析)

トランスフェクションする 24 時間前に、あらかじめ培養した細胞を分割し、プレート上に播いた。製造者のプロトコールに従い 1 ウエル当た

り、1. 2 μ g のプロモータープラスミドと、0. 3 μ g の pCAGGS/ β -gal 関連プラスミドと、3. 75 μ l の F u G E N ETM 6 トランスフェクション試薬 (Roche 社製) とを 6 ウエルディッシュに注入し、細胞 (5 \times 10⁴) をトランスフェクションした。トランスフェクションの
5 24 時間後、100 μ l / ウエルの細胞溶解緩衝液 (PicaGeneTM ルシフェラーゼ分析システム、Toyo Ink 社製) 中で細胞を回収した。4℃で 12000 g \times 5 分間の遠心分離を行った後、上清 (20 μ l 又は 30 μ l) をルシフェラーゼアッセイ及び β -ガラクトシダーゼアッセイにそれぞれ使用した。ルシフェラーゼ活性は BLR-201 luminescence reader
10 (Aloka 社製) を用いて測定した。 β -ガラクトシダーゼアッセイは、文献 (J. Biochem. (Tokyo) 122, 157-167, 1997) 記載の方法に準じて β ガラクトシダーゼ酵素分析システム (Promega 社製) を用いて行った。再現性を確認するため、全実験は最低三回繰り返した。細胞抽出物の β -ガラクトシダーゼ活性を測定することによりトランスフェクション効率
15 を決定し、その値に応じて、ルシフェラーゼ活性 (光ユニット) を補正した。SV40 エンハンサー及び SV40 プロモーターを含む pSV2-Luc 遺伝子の発現を比較することにより、種々の細胞株のトランスフェクション効率を評価した。データは、pSV2-Luc の値に対してノーマライズした吸光度 \pm S. E. を % として表している。

20 A-5 (ウィルスの調製)

ICP4 のコード領域を含む pGH108 (J. Virol. 56, 558-570, 1985) 由来の 4. 1 kb の平滑末端 SalI-MseI 断片 (Johns Hopkins School of Medicine の Hayward 博士より提供) を、pAMP1 プラスミドにクローニングした 333 bp ヒトカルボニンプロモーター
25 (-260 ~ +73) の下流の平滑末端 BamHI サイトに挿入し、及びかかるプラスミドの SmaI サイトにヒト 4F2 重鎖転写エンハンサ

ー (Mol. Cell Biol. 9, 2588-2597, 1989) (Harvard Medical School
の Leiden 氏より提供) の 444 bp の Not I 断片をサブクローンした。
この pAMP1/CALP-ICP4 プラスミドの 3' 側にある Hind
dIII サイトを平滑化し、pIRES2-EGFP プラスミド (Clontech
5 社) を、BamHI と AflIII とを用いて二重消化させることにより得
られた 1576-bp 断片をサブクローンした。この BamHI-Af
lIII 断片は、IRES 配列 (米国特許第 4937190 号明細書) と E
GFP 配列 (米国特許第 5625048 号及び第 5804387 号明細
書) および SV40 由来ポリ A シグナルから構成されている。次に、p
10 AMP1/CALP-ICP4-IRES2-EGFP プラスミドを E
coRI と SphI とを用いて二重消化させることにより得られた 6.
7-kb 断片を平滑化し、pKX2βG3 組換えベクターの StuI 平
滑末端サイトにサブクローニングした (pKX2βG3/CALP-IC
P4-IRES2-EGFP)。pKX2βG3 組換えベクター
15 (Conneticut 大学の Weller 氏より提供) は、ICP6 コード配列の 2.
3-kb XhoI 断片 (pKpX2) とその BamHI サイトに挿入さ
れた 3.0-kb の大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来の LacZ 配列及び
pUC19 のバックボーンからなる (J. Virol. 62, 196-205, 1988)。

続いて、上記プラスミド pKX2βG3/CALP-ICP4-IR
20 ES2-EGFP を XhoI サイト (pKX2βG3 の 5' 側 ICP6
配列の 5' 側にある XbaI サイトと 3' 側 ICP6 配列の 3' 側にあ
る HindIII サイトをともに XhoI サイトで置換したもの) で線状
化し、pUC19 配列を除去した pRRΔ-CALP-ICP4-IR
ES2-EGFP と d120 ウイルス DNA とを、製造者のプロトコル
25 に従って Lipofectamine™ (GIBCO/BRL 社製) を使用し、6 ウェル組織培
養プレート中の ICP4cDNA を導入した Vero E5 細胞 (2.5×10^5

／well) のサブコンフルエント単層培養にコトランスフェクションした。トランスフェクション3時間後に20%DMEM培養液1mlを添加し、96時間後まで、4-hydroxymethylbenzoic acid (HMB A) 0.5 mg / ml を含む前記培養液(10% FBS / DMEM) で培養した。

- 5 プラーク形成を確認した後、HMB A を含まない10% FBS / DMEM で24時間培養した。500 μ l / ウェルのコールドウイルスバッファ(150 mM の NaCl を含む20 mM の Tris - HCl ; pH 7.5) に細胞を懸濁し、凍結保存した。

- 超音波処理(30秒間を3回)を組み合わせた凍結処理と解凍処理を
10 三回行い、上記懸濁液を溶解した。懸濁液を段階的に希釈し、96ウェル組織培養プレートのサブコンフルエント単層培養SK-LMS-1細胞に感染させた。感染後96時間1ウェルあたり100 μ l の11.3 μ g / ml のヒトIgG (Jackson ImmunoResearch Lab. 社製) を含む1% FBS / DMEM で培養した。プラーク形成を確認し得たウェルを蛍光
15 顕微鏡下でのGFPの発現を指標にしてスクリーニングした。GFP陽性のプラークを含むウェルのSK-LMS-1単層培養細胞を前記培養液100 μ l に懸濁し、そのうちの6 μ l を用いて、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド(X-gal) を基質にした β ガラクトシダーゼ酵素活性を、 β ガラクトシダーゼ酵素
20 分析システム(Promega 社製)を用いて測定した。 β ガラクトシダーゼ酵素活性陽性のウェルのSK-LMS-1細胞懸濁液を5000回転で5分間遠心し、ペレットを100 μ l / ウェルのコールドウイルスバッファに懸濁した。96ウェル組織培養プレートを用いた同様の限界希釈感染・ β ガラクトシダーゼ酵素活性測定法をVer o E5細胞を用い
25 てさらに2回繰り返す、組換えウィルスベクターd12・CALP・ Δ RRを単一のプラークとして精製した。ウィルスDNAを精製した後、

制限酵素 X h o I で消化し、I C P 6 c D N A の X h o I 断片 (2 . 3 - k b) をプローブにしたサザンブロット分析によりリボヌクレオチド還元酵素遺伝子座 (I C P 6 o r R R - l o c u s) での組換えを確認し得た (図 1) 。

- 5 1 0 ~ 2 0 個の 1 5 0 c m ² / tissue culture flasks (IWAKI CLASS 社製) 中の E 5 細胞に感染させ、4 8 時間後に剥離した細胞を回収することにより、ウィルスを調製した。4 ℃ で 5 分間、4 0 0 × g で遠心分離を行って細胞を収集し、1 0 m l のコールドウィルスバッファー (1 5 0 m M の N a C l を含む 2 0 m M の T r i s - H C l ; p H 7 . 5)
- 10 に懸濁した。超音波処理 (3 0 秒間を 3 回) を組み合わせた凍結処理と解凍処理を三回行い、上記細胞を溶解した。4 ℃ で 5 分間、1 5 0 0 × g で遠心分離を行ったあと、その上清に対してさらに 4 ℃ で 4 5 分間、1 5 0 0 0 × g で遠心分離を行った。その結果得られたペレットをコールドウィルスバッファーに懸濁し、V e r o E 5 細胞におけるブランク
- 15 アッセイにより精製した d 1 2 ・ C A L P ・ Δ R R ウィルスベクターの力価を決定した。

A - 6 (インビトロでの細胞崩壊分析及びウィルス複製分析)

- 1 % の熱不活性 F B S / P B S 中で、感染多重度 (M O I) が 0 . 1 ~ 0 . 0 0 1 p f u / c e l l で、6 ウエル組織培養プレート中の細胞
- 20 のサブコンフルエント単層培養に d 1 2 ・ C A L P ・ Δ R R ウィルスベクターを感染させた。かかる感染細胞を 3 7 ℃ で 1 時間インキュベートし、その後、1 % の F B S と 1 1 . 3 μ g / m l のヒト I g G (Jackson ImmunoResearch Lab. 社製) を含む前記培地で培養した。感染の 4 8 時間後、ブランク / ウエルの数を計測した。ウィルス複製分析のために、1
- 25 2 ウエル組織培養プレート中の S K - L M S - 1 細胞又は O S T 細胞の単層培養 (2 × 1 0 ⁵ 細胞 / w e l l) に、1 % の F B S / P B S 中に

て、感染多重度 (MOI) が 0.1 となるように d12・CALP・ Δ RR ウィルスベクターを感染させた。接種したウィルスを 1 時間後に取り除き、上記細胞を前記培地でインキュベートした。所定の時間 (12 時間、24 時間、48 時間) に、 $100 \mu\text{l}$ のウィルスバッファーを用いて感染細胞をウエルから剥がした。細胞懸濁液 ($1 \mu\text{l}$) を 10^{-3} 、 10^{-4} 及び 10^{-5} に希釈し、その後 Vero E5 細胞におけるウィルスの力価を決定した。

また、1% の熱不活性 FBS / PBS 中で、感染多重度 (MOI) が $0.01 / \text{cell}$ で、6 ウエル組織培養プレート中の MFH-A1-LM 細胞 (ヒト悪性線維性組織球種 MFH-A1 細胞の高肺転移性細胞株) のサブコンフルエント単層培養に d12・CALP・ Δ RR ウィルスを感染させた。また、感染多重度 (MOI) が $0.1 / \text{cell}$ 又は $0.01 / \text{cell}$ で、6 ウエル組織培養プレート中のヒト GIST 細胞及びヒト子宮筋腫培養細胞のサブコンフルエント単層培養に d12・CALP・ Δ RR ウィルスをそれぞれ感染させた。かかる感染細胞を 37°C で 1 時間インキュベートし、その後、1% の FBS と $11.3 \mu\text{g} / \text{ml}$ のヒト IgG (Jackson ImmunoResearch Lab. 社製) を含む前記培地で培養した。感染の 72 時間後、X-Gal 染色しブラック / ウエルの数を計測した。

A-7 (インビトロでのウィルス複製の抗ヘルペスウイルス剤ガンシクロビル (ganciclovir) に対する感受性分析)

1% の熱不活性 FBS / PBS 中で、感染多重度 (MOI) が $0.01 \text{ pfu} / \text{cell}$ で、24 ウエル組織培養プレート ($5 \times 10^4 / \text{well}$) または 6 ウエル組織培養プレート ($2.5 \times 10^5 / \text{well}$) 中の SK-LMS-1 細胞のサブコンフルエント単層培養にウィルスを感染させた。かかる感染細胞を 37°C で 1 時間インキュベートし、その

後、1%のFBSと11.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒトIgG (Jackson ImmunoResearch Lab. 社製)、種々の濃度 (0 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) のガンシクロビル (ganciclovir) (和光純薬社製) を含む前記培地で培養した。感染の48時間後に1ウェルあたりのプラーク数を計測した。

- 5 ICP4発現のイムノブロット分析のため、SK-LMS-1細胞及びOST細胞に、感染多重度 (MOI) が0.01となるようにd12. CALP又はウィルスバッファーのみをそれぞれ感染させ、22時間培養したのち回収した。同量のタンパク質を9%のSDS-PAGEゲル電気泳動にかけ、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad 社製) に移した。5%
10 のスキムミルク (DIFCO Laboratories 社製) を用いて、膜を室温で2時間ブロッキングし、その後、抗ICP4抗体 (希釈率1:1000) を用いて、4℃で一晩インキュベートした。

A-8 (インビボでの処理及び組織学的分析)

- ヒト皮下移植腫瘍に対するd12. CALP Δ RRベクターの1回静
15 脈内投与による治療効果を検討するために、ヒト悪性線維性組織球種MFH-AI細胞 1×10^7 個を、6週齢の雌の無胸腺症ヌードマウス (BALB/c S1c-nu/nu) (日本SLC社製) の体側部に皮下注射して、腫瘍を定着させた。腫瘍は、ヌードマウスに移植後19日で直径6から7mm程度 (50 ~ 70 mm^3) に成長した。 1×10^7 pfu
20 /マウスのd12. CALP Δ RRベクターを含む100 μl のウィルス懸濁液 (n=6)、あるいは同量のウィルス緩衝液 (n=6) を、30ゲージの針を用いてそれぞれ尾静脈内に1回注入した。注入後所定の時間に腫瘍を測定し、式 [0.53 \times 長さ \times 幅の2乗] を用いて腫瘍容積を計算した。

- 25 また、ヒト肺転移腫瘍に対するd12. CALP Δ RRベクターの静脈内投与による治療効果を検討するために、ヒト悪性線維性組織球種M

FH-AI細胞の高肺転移性の細胞株MFH-AI-LM細胞 1×10^6 個を6週齢の雌の無胸腺症ヌードマウス(BALB/c Slc-nu/nu)(日本SLC社製)の尾静脈から1回注射して肺転移腫瘍モデルを作製した。MFH-AI-LM細胞を静脈注射した14日後、組織学的研究のため、 1×10^7 pfu/マウスのd12. CALP Δ RRベクターを含む 100μ lのウィルス懸濁液を、30ゲージの針を用いて1回静脈内投与し、その13日後にマウスを絶命させた。肺転組織全体並びに脳、肝臓、腎臓、心臓、小腸、子宮及び卵巣を取り出し標本とした。これら標本を、2%のパラホルムアルデヒド、0.5%のグルタルアルデヒドを用いて、1mMのMgCl₂を含むPBSで、4℃で1晩固定した。続いて、X-Gal(1mg/ml)、5mMのK₃Fe(CN₆)、5mMのK₄Fe(CN₆)及び1mMのMgCl₂をPBS中に含む基質溶液に、該腫瘍を37℃で4時間浸し、その後、3%のDMSOを含むPBSで洗浄し、X-Gal染色を行った。また、上記肺転組織全体の標本をブアン溶液[15%(v/v)の飽和ピクリン酸溶液、1.65%(v/v)のホルマリン、及び1%(v/v)の酢酸/PBS]で固定し、パラフィンに包埋した。ポリ-L-リジンでコートしたマイクロスライドに、厚さ 4μ mの切片をのせ、キシレン中で処理し、段階的濃度のアルコール溶液で脱水した。その後、Hematoxylin-Eosin染色を行い、d12. CALP Δ RRによる腫瘍組織の破壊を倒立型顕微鏡(オリンパスBX-50)を用いて観察した。

次に、MFH-AI-LM細胞 1×10^6 個又は 5×10^5 個を6週齢の雌の無胸腺症ヌードマウス(BALB/c Slc-nu/nu)(日本SLC社製)の尾静脈から注射して肺転移腫瘍モデルを作製した。MFH-AI-LM細胞を静脈注射した17日目、27日目及び34日目に、 1×10^7 pfu/マウスのd12. CALP Δ RRベクターを含

む $50 \mu\text{l}$ のウィルス懸濁液を、 30 ゲージの針を用いて 3 回静脈内投与し、 13 日後にマウスを絶命させた。肺転組織全体を取り出し、 2% のパラホルムアルデヒド、 0.5% のグルタルアルデヒドを用いて、 1 mM の MgCl_2 を含む PBS で、 4°C で 1 晩固定し、ヒト肺転移腫瘍
5 に対する $d12$. $\text{CALP}\Delta\text{RR}$ ベクターの静脈内投与による治療効果を調べた。

A-9 (統計学的分析)

無対の $\text{Student's } t\text{-test}$ を使って、統計的差異を確認した。差異は $p < 0.05$ で、統計的に有意であると考えられた。

10 実施例 B [結果]

B-1 (カルボニン陽性細胞における組換え HSV ベクターのインビトロでの選択的複製)

カルボニン陽性細胞及び増殖細胞中で選択的に複製する HSV ベクターを構築するため、 $4\text{F}2$ エンハンサー／ -260 カルボニンプロモーター／ $\text{ICP}4$ ／ $\text{IRES}-\text{EGFP}$ を含む DNA 断片を、 $\text{ICP}4$ - HSV 変異体 $d120$ (*J. Virol.* 56, 558-570, 1985) の $\text{RR}(\text{ICP}6)$ 遺伝子座 (U_L36) に相同組み換え法を用いて挿入し、 $d12$. $\text{CALP}\Delta\text{RR}$ ベクターを作製した。 $d12$. $\text{CALP}\Delta\text{RR}$ ベクターは、 $\text{ICP}6$ プロモーターの制御下に β -ガラクトシダーゼを発現し、カル
15 ポニンプロモーターの制御下に $\text{ICP}4$ タンパク質と EGFP たんぱく質を発現させることが可能である (図1)。カルボニン発現ヒト平滑筋肉腫細胞株 (SK-LMS-1) とカルボニン非発現ヒト骨肉腫細胞株 (OST) を使用して、 $d12$. $\text{CALP}\Delta\text{RR}$ ベクターのウィルス複製の細胞選択性を評価した。

25 ウィルス力価を感染多重度 0.1 ($2 \times 10^5 \text{ cells/well}$) のシングルステップグロースアッセイで評価した。 $d12$. $\text{CALP}\Delta$

RRベクターは、カルボニン陽性SK-LMS-1細胞中で複製したが、
d12. CALPΔRRの力価は感染の72時間後のカルボニン陰性O
ST細胞中ではSK-LMS-1細胞に比べて $1/10^5$ 程度に減少し
た(図2)。両細胞の増殖速度は同程度であった。感染22時間後の細胞
5 抽出物のイムノブロット分析を行った結果、SK-LMS-1細胞では
ICP4タンパク質が発現しているが、OST細胞ではICP4タンパ
ク質が発現していないことがわかった。これはウィルス複製分析結果と
一致していた。これに対し、相同組み換えの親株であるd120ウィル
スベクターは、SK-LMS-1及びOSTの培養物において子孫ウィ
10 ルスの産生はまったく見られなかった。

6ウェルディッシュ中のSK-LMS-1細胞にd12. CALPΔ
RRベクターを感染させ、感染の96時間後に、X-galアガロース
オーバーレイでβ-ガラクトシダーゼ発現細胞を青色に染色し、同時に
倒立型蛍光顕微鏡で、EGFPの発現を検証した。崩壊し死滅しつつあ
15 る腫瘍細胞にβ-ガラクトシダーゼが発現し、その周囲の生細胞にEG
FPが発現していることが確認できた(図3)。

1個の細胞に、両者の発現が同時に存在する例も多数観察された。

B-2(組換えHSV-1ベクターの抗ヘルペスウイルス剤ガンシクロ
ビル(ganciclovir)に対する感受性)

20 d12. CALPΔRRベクターをヒト悪性腫瘍の治療に応用する場
合、最も重要な特性は、TK遺伝子をインタクトな状態でもつため、抗
ヘルペスウイルス剤であるガンシクロビル(ganciclovir)に感受性を示
すことである。24ウェル(5×10^4 /well)ディッシュ中のS
K-LMS-1細胞に、種々の濃度(0~100ng/ml)のガンシ
25 クロビル(ganciclovir)存在下で、d12. CALPΔRRを多重感染度
0.01で感染させ、感染の48時間後に、X-galを基質にして染

色し、1ウェルあたりの β -ガラクトシダーゼ陽性のプラーク数を計測した。また、6ウェルディッシュ中のVeroE5細胞(2.5×10^5 /well)に $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のガンシクロビル(ganciclovir)存在下と非存在下で、d12. CALP Δ RRベクターを感染させ、感染の48時間後に、X-galを基質にして染色した(図4)。

SK-LMS-1細胞、ICP4cDNAを導入したVeroE5細胞共に、ガンシクロビル(ganciclovir)の存在下でd12. CALP Δ RRベクターの複製が抑制された。SK-LMS-1細胞では、 $40 \text{ ng}/\text{ml}$ のガンシクロビル(ganciclovir)存在下で完全に抑制された。d12. CALP Δ RRベクターは、野性型ウイルスよりも同薬剤に感受性が高いことが報告されている(Cancer Res. 54, 3963-3966, 2001)複製可能型HSV-1変異体hrR3と同等のガンシクロビル(ganciclovir)に対する感受性を示した。この結果は、d12. CALP Δ RRベクターが治療後にガンシクロビル(ganciclovir)またはアシクロビル(aciclovir)でウイルス感染細胞を除去できる安全策を備えていることを示している。

B-3 (インビボでの処理及び組織学的分析)

MFH-AI-LM細胞株がカルボニンのmRNAを発現しているかどうかを、MFH-AI-LM細胞株の全RNAを対象とするRT-PCR分析により調べたところ、MFH-AI-LM細胞株がカルボニンのmRNAを発現していることが確認された(図5a)。また、上記MFH-AI-LM細胞株に、感染多重度0.01のd12. CALP Δ RRベクターを72時間感染させた。ベクターの複製は、X-Gal染色しプラーク形成を指標として評価した(図5b)。その結果、d12. CALP Δ RRベクターはMFH-AI-LM細胞内で複製され、MFH-AI-LM細胞に対して細胞溶解活性を示すことが確認された。さらに、GIST細胞及び子宮筋腫培養細胞に、感染多重度0.01又は0.

1 の d 1 2 . C A L P Δ R R ベクターをそれぞれ 7 2 時間感染させた。
ベクターの複製は、X-Gal 染色しプラーク形成を指標として評価し
た (図 6)。その結果、d 1 2 . C A L P Δ R R ベクターは G I S T 細胞
(6 図 a , b) 及び子宮筋腫培養細胞 (6 図 c , d) 内で複製され、0 .
5 0 1 M O I (6 図 a , c) 及び 0 . 1 M O I (6 図 b , d) の結果から
投与量に依存して細胞溶解活性を示すことが確認され、特に、0 . 1 M
O I (6 図 b , d) の投与では視野中のすべての腫瘍細胞への d 1 2 .
C A L P Δ R R ベクターの感染が認められた。

M F H - A I 細胞により定着した皮下腫瘍に対する d 1 2 . C A L P
10 Δ R R ベクターのインビボでの抗腫瘍効果を調べた。M F H - A I - L
M 細胞株の皮下移植腫瘍に対する d 1 2 . C A L P Δ R R ベクターの 1
回静脈内投与による治療効果を経時変化として表した (図 7)。0 日に
 1×10^7 p f u / マウスの d 1 2 . C A L P Δ R R を尾静脈から注入し
た。静脈注射後 2 9 日目の治療 (d 1 2 . C A L P Δ R R 投与) 群と未
15 治療 (P B S 投与) 群の腫瘍体積 (m e a n \pm S . E . , n = 6) は、そ
れぞれ 500 ± 136 mm³ と 183 ± 33 mm³ であった。治療群は未
治療群に比べて有意な抗腫瘍効果を示した。

ヒト肺転移腫瘍に対する d 1 2 . C A L P Δ R R の静脈内投与による
インビボでの治療効果を調べた (図 8)。ヒト悪性線維性組織球種 M F H
20 - A I 細胞の高肺転移性株 M F H - A I - L M 細胞を用いた肺転移腫瘍
モデルマウスの尾静脈から、 1×10^7 p f u / マウスの d 1 2 . C A
L P Δ R R ベクターを注入後 1 3 日目の肺転移腫瘍 (図 8 a , b) 及び
正常組織である脳 (図 8 c)、心臓 (図 8 d)、肝臓 (図 8 e) の X - G
a l 染色、並びに、Hematoxylin-Eosin 染色による肺転移腫瘍の組織学
25 的解析 (図 8 f , g) を行った。d 1 2 . C A L P Δ R R の 1 回静脈内
投与によって、肺転移巣に d 1 2 . C A L P Δ R R ベクターの複製を示

す X-Gal 染色と組織学的に腫瘍の壊死が認められたが、脳、心臓、肝臓などの正常組織ではベクターの感染と複製を示す X-Gal 染色は認められなかった。

次に、MFH-AI-LM細胞の投与細胞数を 1×10^6 個又は 5×10^5 個とし、MFH-AI-LM細胞の投与後17日目、27日目及び34日目に 1×10^7 pfu/マウスのd12、CALPΔRRベクターを計3回静脈内投与した場合のヒト肺転移腫瘍の治療効果を調べた(図9)。MFH-AI-LM腫瘍細胞 1×10^6 個又は 5×10^5 個を尾静脈から注射して作製した肺転移腫瘍モデルのいずれに対しても、d12、CALPΔRRベクター投与の治療群の肺転移腫瘍抑制効果は明らかであった。また、Hematoxylin-Eosin 染色による組織学的解析によっても治療群での転移抑制効果が確認された。

産業上の利用可能性

15 間葉系細胞由来の悪性腫瘍すなわち肉腫は、化学療法や放射線療法に抵抗性で、外科的切除後も再発を繰り返し、最終的には肺、肝、腹膜などに転移し予後が悪い。わが国における症例数は、消化器外科領域のストローマ腫瘍(GIST)、整形外科領域の骨・軟部肉腫を中心に婦人科領域の平滑筋肉腫、胸部・消化器外科領域の悪性中皮腫、脳外科領域の繊維肉腫、悪性髄膜腫、悪性神経鞘腫等を合わせて年間5000例前後の初発例がある。全がんのおよそ1~2%と少ないものの、若年者にも多発し化学療法に感受性のある一部の症例を除いては有効な治療法がないことから、新治療法の開発を切望する社会的要請が強い。肉腫の病因、病態に関連する遺伝子解析は、骨肉腫や平滑筋肉腫でp53とRb遺伝子、GISTでKIT遺伝子の変異、Ewing肉腫や滑膜肉腫、脂肪肉腫で融合遺伝子の存在が報告されているが、まだ治療に応用できる段

階にはない。また、これまでの動物実験で、p 5 3 やサイトカイン、自殺遺伝子である単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)などを種々のベクターを用いて肉腫細胞に直接導入する方法が試みられたが、十分な治療効果が得られていない。

- 5 遺伝子治療は、がん細胞に導入する遺伝子の細胞選択的な作用や発現プロモーターの活性、ウイルスベクターの感染導入など、いろいろなレベルでがん細胞選択性を高めることが可能であり、肉腫に対しても有望な治療法として注目されている。実際、オステオカルシンのプロモーターを用いてHSV-tkを複製能力のないアデノウイルスベクターで骨肉腫選択的に発現させることにより、静脈内投与でも肺転移巣を有意に抑制し得ることが報告された(Cancer Gene Ther. 5, 274-280, 1998)。
- 10 しかし、オステオカルシンは分化段階にある正常な骨芽細胞にも発現しているので、導入遺伝子の発現を制御するだけでは、がん細胞選択性を高めるには不十分である。加えて、分化のマーカー遺伝子のプロモーターによって細胞選択性を高めることは、一方でベクターの汎用性を低下
- 15 させることであり、多種多様な組織、細胞に由来し、それぞれの症例数が限られている肉腫の場合、ベクター開発の費用対効果の面で不利である。

- さらに、これまでの肉腫に対する実験的遺伝子治療に用いられた複製能力を欠如したウイルスベクターやリポソームベクターでは、すべての
- 20 がん細胞に治療遺伝子を導入することは不可能である。したがって、動物実験で延命効果は得られるものの持続的な抗腫瘍効果は期待できない。また、がん細胞への遺伝子導入効率が低ければ、それだけ大量のウイルスベクターが必要であり、過剰な免疫反応やアレルギー反応が起きる危険性も高まる。
- 25

難治性肉腫の治療には、何か従来の方法とは異なる全く新しいアプロ

一チが必要であると考えられてきたが、その手がかりは得られていなかった。本発明の実施例はかかる要望等に応えうるものであり、本発明によると、肉腫に限らず悪性腫瘍等の特定の細胞で複製し腫瘍細胞を破壊しつつ特異的に治療遺伝子を発現する、正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを提供することができる。治療終了後に薬剤でウイルスの複製を停止させることができる安全策を備えたかかる細胞特異的発現複製ベクターを用いることにより、世界で最初のヒトを対象にした細胞選択的な発現複製ベクターを用いた遺伝子治療が可能となる。

カルボニン遺伝子は成体では主として平滑筋細胞に発現しており、特に血管平滑筋細胞の増殖は、腫瘍血管新生やステント留置後の血管狭窄、糖尿病性網膜症などの増殖性血管病変の原因であるため、本発明によって提供されるカルボニンプロモーターをもつ平滑筋細胞特異的発現複製ベクターで、増殖する平滑筋細胞を選択的に破壊することにより、これらの疾患をも治療することが可能である。中でも、本発明によつてはじめて可能となる腫瘍血管平滑筋を選択的に破壊する治療法は、すべての固形癌に有効ながん治療法として、画期的な効果をもたらす可能性がある。さらに、カルボニンを発現するメサングウム細胞の増殖によっておこる増殖性糸球体腎炎や、カルボニンを発現する筋線維芽細胞の増殖によっておこる肺や肝臓などの線維症に対する治療剤としても有効に作用し得るものである。

請 求 の 範 囲

1. 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域を所定の遺伝子の
上流に組み込んだ成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクタ
5 ーにおいて、前記細胞特異的発現複製ベクターに存在するチミジンキナ
ーゼ (Thymidine kinase) 遺伝子を利用して所望の時期にその複製を抑
制しうることを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複
製ベクター。
2. 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号 1 に
10 示される塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 1 記載の成
体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
3. 配列番号 1 に示される塩基配列を含む領域が、配列番号 2 に示され
る塩基配列からなるヒトカルポニン遺伝子プロモーターを含む領域であ
ることを特徴とする請求項 2 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異
15 的発現複製ベクター。
4. 配列番号 2 に示される塩基配列を含む領域が、配列番号 3 に示され
る塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求項 3 記載の成体正常
細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
5. 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が、配列番号 1、
20 配列番号 2 又は配列番号 3 に示される塩基配列において、1 若しくは数
個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ転写
開始制御活性を有する塩基配列を含む領域であることを特徴とする請求
項 1 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
6. 転写開始制御領域の上流にエンハンサーが組み込まれていることを
25 特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細
胞特異的発現複製ベクター。

7. エンハンサーが 4 F 2 エンハンサーであることを特徴とする請求項 6 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
8. 所定の遺伝子のさらに下流に、所定の遺伝子とは異なる目的タンパク質をコードする DNA が連結され、前記転写開始制御領域の制御下に
- 5 目的タンパク質を発現することを特徴とする請求項 1 ～ 7 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
9. 目的タンパク質をコードする DNA が、IRES (internal ribosomal entry site) を介して所定の遺伝子に連結されていることを特徴とする請求項 8 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製
- 10 ベクター。
10. 目的タンパク質をコードする DNA が、アポトーシス促進関連遺伝子であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
11. 目的タンパク質をコードする DNA が、血管新生抑制作用をもつ
- 15 タンパク質をコードする DNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
12. 目的タンパク質をコードする DNA が、癌転移抑制作用をもつタンパク質をコードする DNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
- 20 13. 目的タンパク質をコードする DNA が、癌抑制作用をもつタンパク質をコードする DNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。
14. 所定の遺伝子が、ウイルス複製関連遺伝子であることを特徴とする請求項 1 ～ 13 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異
- 25 的発現複製ベクター。
15. ウイルス複製関連遺伝子が、ICP 4 又は E1A であることを特

徴とする請求項 1 4 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

1 6 . 発現複製ベクターが、ウイルスベクターであることを特徴とする請求項 1 ～ 1 5 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的
5 発現複製ベクター。

1 7 . ウイルスベクターが、単純ヘルペスウイルスベクター（H S V ベクター）又はアデノウイルスベクターであることを特徴とする請求項 1 6 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

1 8 . 腫瘍細胞特異的、腫瘍新生血管の増殖平滑筋特異的、増殖性血管
10 病変における増殖平滑筋特異的、糸球体腎炎における増殖メサングウム細胞特異的、又は線維症における増殖筋線維芽細胞特異的な発現複製ベクターであることを特徴とする請求項 1 ～ 1 7 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

1 9 . リボヌクレオチドリダクターゼ（Ribonucleotide reductase）を
15 コードする D N A を欠失していることを特徴とする請求項 1 ～ 1 8 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクター。

2 0 . 請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させることを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製方法。
20

2 1 . 請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させ、その後の所望の時期に、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制することを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法。
25

2 2 . 細胞特異的発現複製ベクターの発現複製の抑制が、アシクロビル

(aciclovir)、ガンシクロビル (ganciclovir) 等の抗ウイルス薬を用いることによる抑制であることを特徴とする請求項 21 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現複製・抑制方法。

5 23. 請求項 1～19 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、生体細胞組織に導入し、発現複製させて前記細胞特異的発現複製ベクターによるチミジンキナーゼ活性を測定することを特徴とする成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法。

10 24. チミジンキナーゼ活性の測定が、 ^{124}I でラベルしたウラシル誘導体 FIAU を用いる Positron Emission Tomography による測定であることを特徴とする請求項 23 記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターの生体内分布を検出する方法。

25 25. 生体細胞組織が、腫瘍組織、血管またはリンパ管狭窄組織、腎炎組織又は線維症組織であることを特徴とする請求項 20～24 のいずれか記載の方法。

26. 請求項 1～19 のいずれかに記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを含むことを特徴とする治療薬。

20 27. 悪性腫瘍、線維症、増殖性血管病変又は増殖性糸球体腎炎に対する治療薬であることを特徴とする請求項 26 記載の治療薬。

28. 悪性線維性組織球種、消化管ストローマ腫瘍又は子宮筋腫に対する治療薬であることを特徴とする請求項 27 記載の治療薬。

25 29. 請求項 1～19 のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、肺、肝臓などの線維症組織又は乳がん、胃がん、膵臓がんなどの悪性腫瘍組織に導入し、ベクターの複製と遺伝子、蛋白およびペプチドの発現によって、増殖筋線維芽細胞を選択的に破壊

することを特徴とする線維症及び悪性腫瘍の治療方法。

30. 悪性線維性組織球種、消化管ストローマ腫瘍又は子宮筋腫を対象とすることを特徴とする請求項29記載の線維症及び悪性腫瘍の治療方法。

5 31. 請求項1～19のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、血管またはリンパ管の狭窄組織あるいは動脈硬化組織、糖尿病性網膜症組織に導入し、ベクターの複製と遺伝子、タンパク質又はペプチドの発現によって、増殖平滑筋細胞又は血管周細胞を選択的に破壊することを特徴とする増殖性血管病変の治療方法。

10 32. 請求項1～19のいずれか記載の成体正常細胞に作用しない細胞特異的発現複製ベクターを、腎炎組織に導入し、ベクターの複製と遺伝子、タンパク質又はペプチドを発現させ、増殖メサングウム細胞を選択的に破壊することを特徴とする増殖性糸球体腎炎の治療方法。

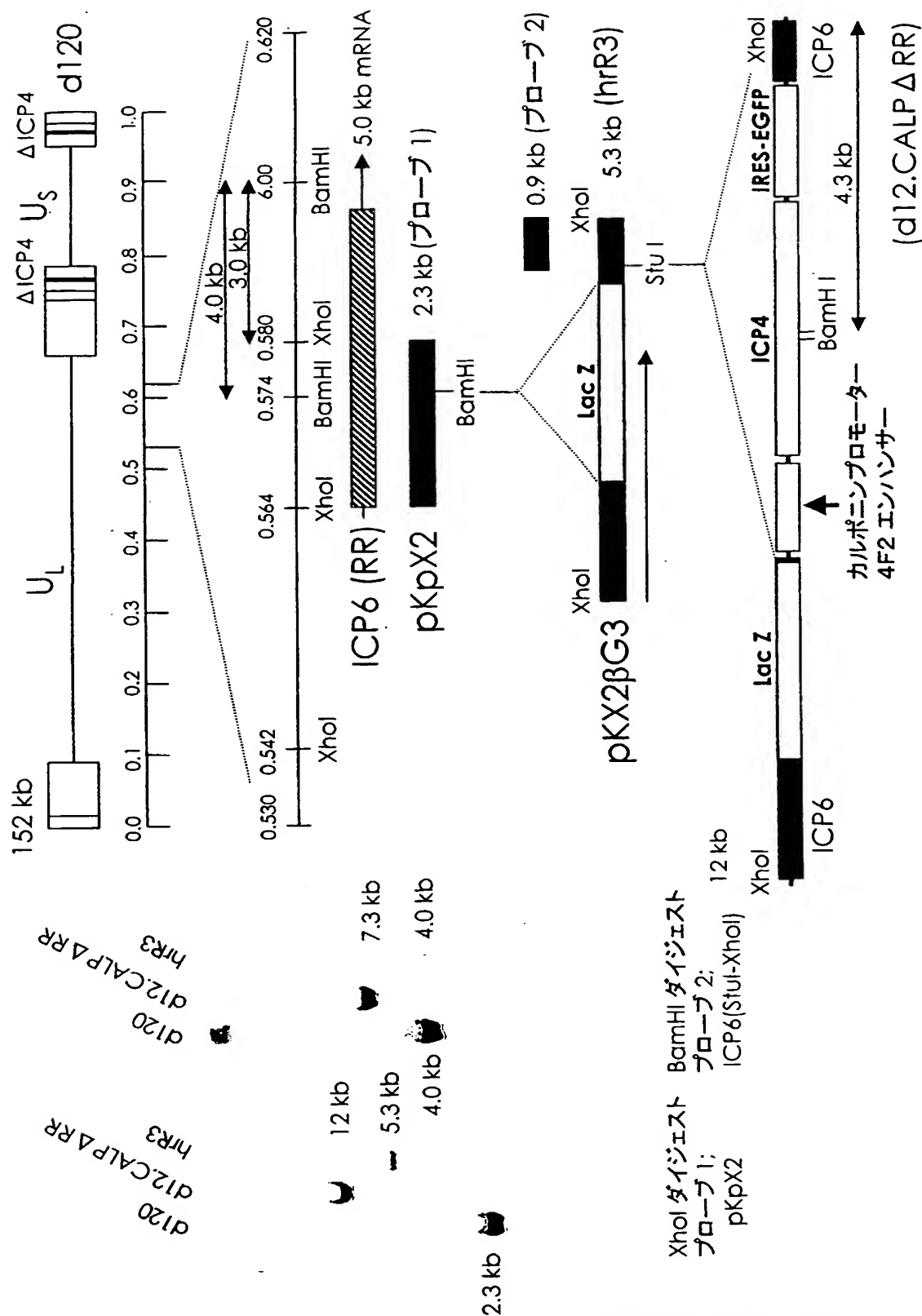
15 33. 細胞特異的発現複製ベクターを、静脈又は動脈に投与することを特徴とする請求項29～32のいずれか記載の治療方法。

34. 所望の時期に、細胞特異的発現複製ベクターの発現複製を抑制することを特徴とする請求項29～33のいずれか記載の治療方法。

20 35. 細胞特異的に発現する遺伝子の転写開始制御領域が活性化され得る細胞又は該遺伝子を発現する細胞に、請求項1～19のいずれか記載の細胞特異的発現複製ベクターを含む相同組み換え後のウイルス混合液を感染させ、ベクター内に組み込んだ遺伝子の発現を指標にして、アガロースゲルオーバーレイ法を用いず、限界希釈法によって単一クローンにまで精製することを特徴とする細胞特異的発現複製ベクターの製造方法。

25 36. 細胞が、ICP4(−)細胞であることを特徴とする請求項35記載の細胞特異的発現複製ベクターの製造方法。

第 1 図

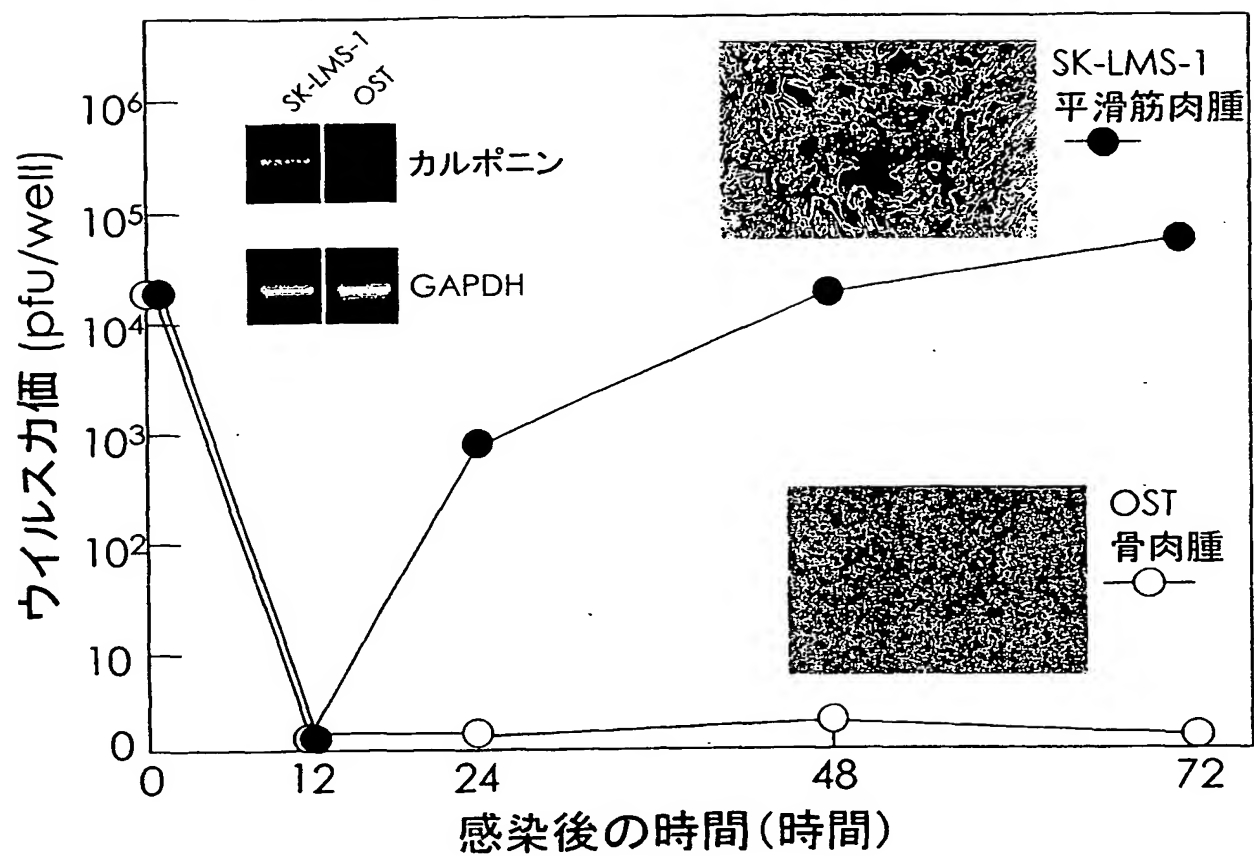


BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 2 図

シングルステップグロースアッセイ

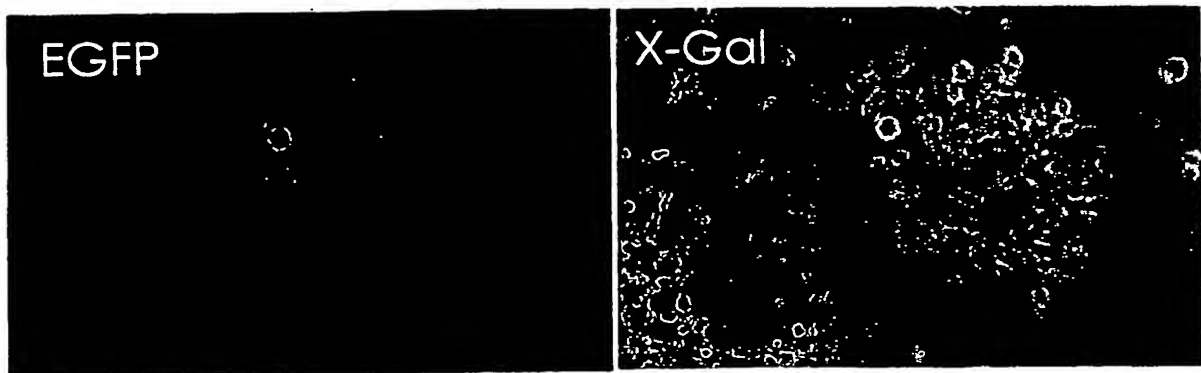


BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 3 図

SK-LMS-1 平滑筋肉腫



オリジナル倍率 x 20

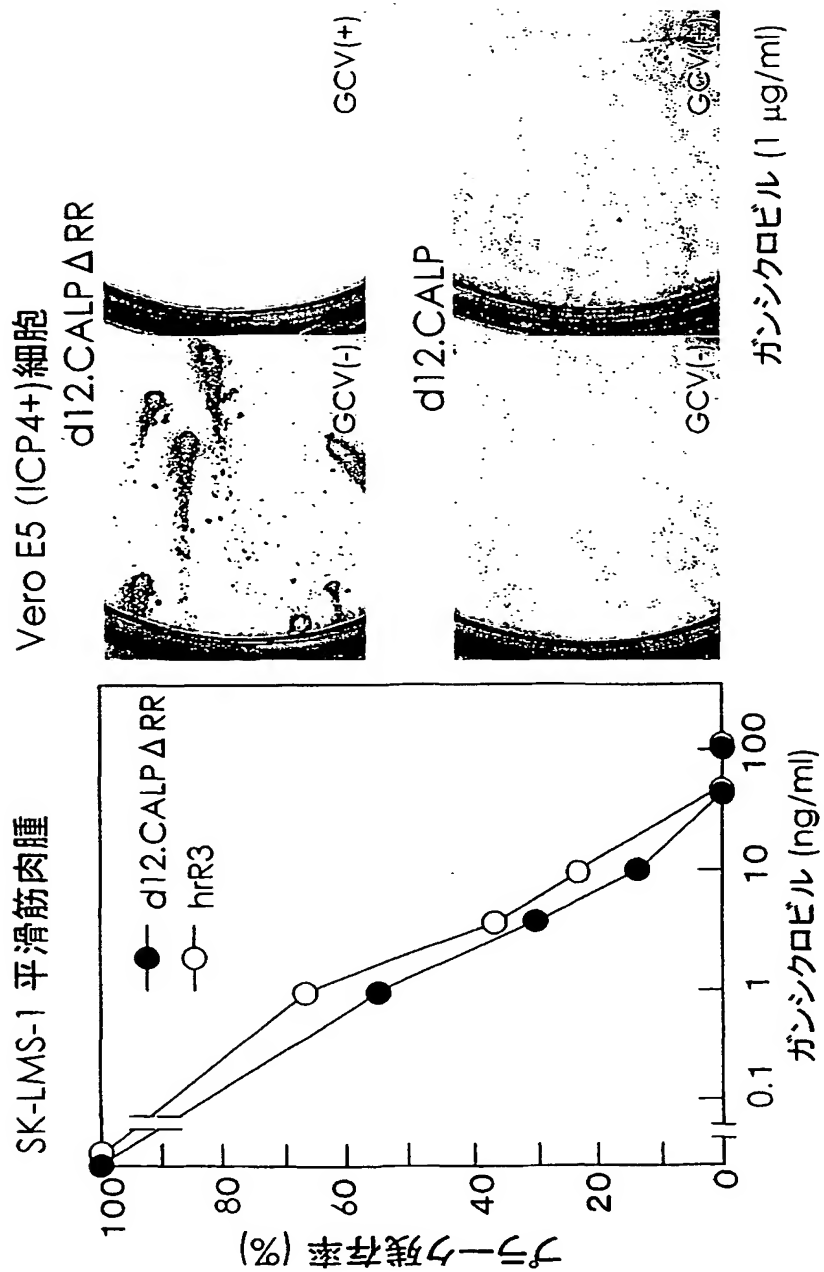


オリジナル倍率 x 10

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

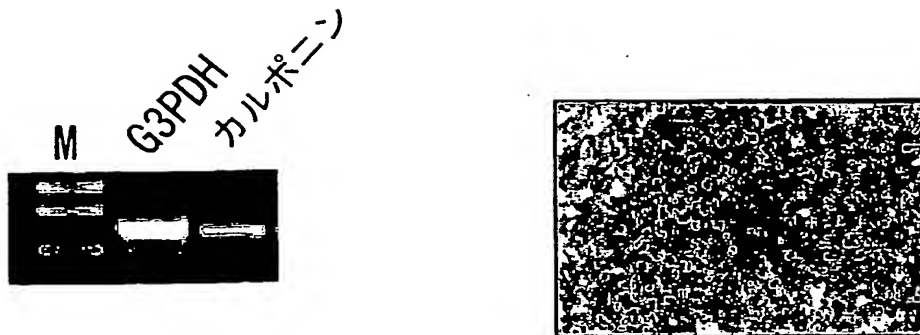
第 4 図



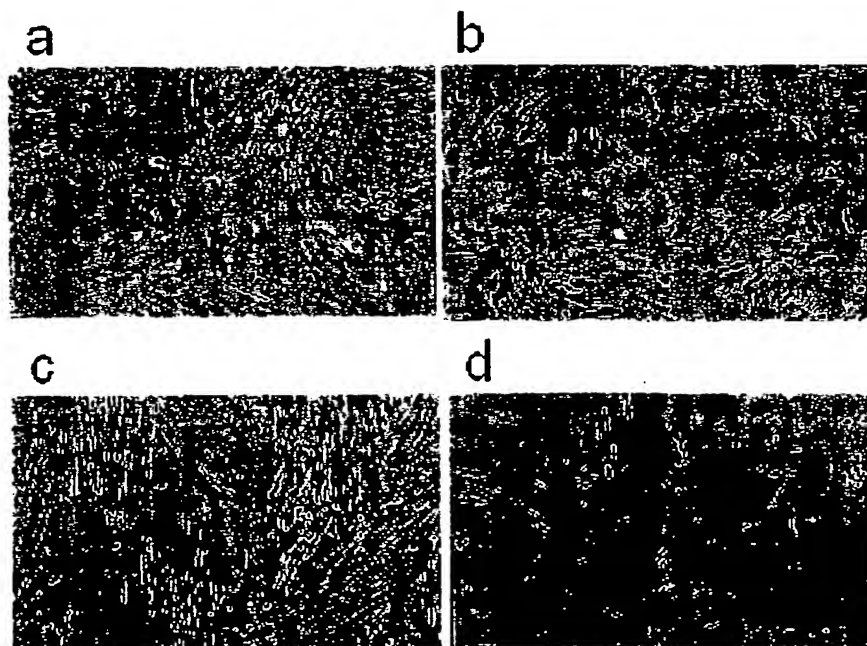
BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 5 図



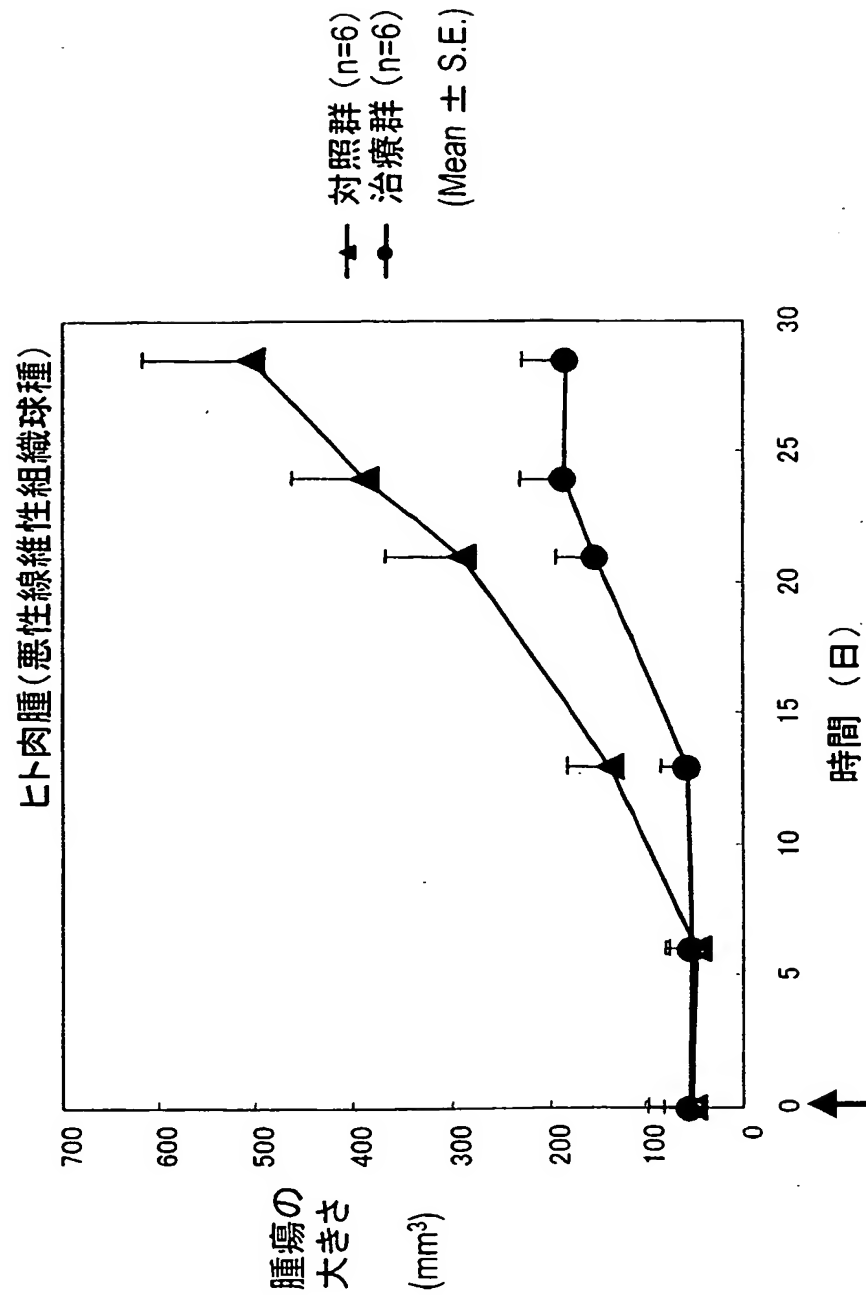
第 6 図



BEST AVAILABLE COPY

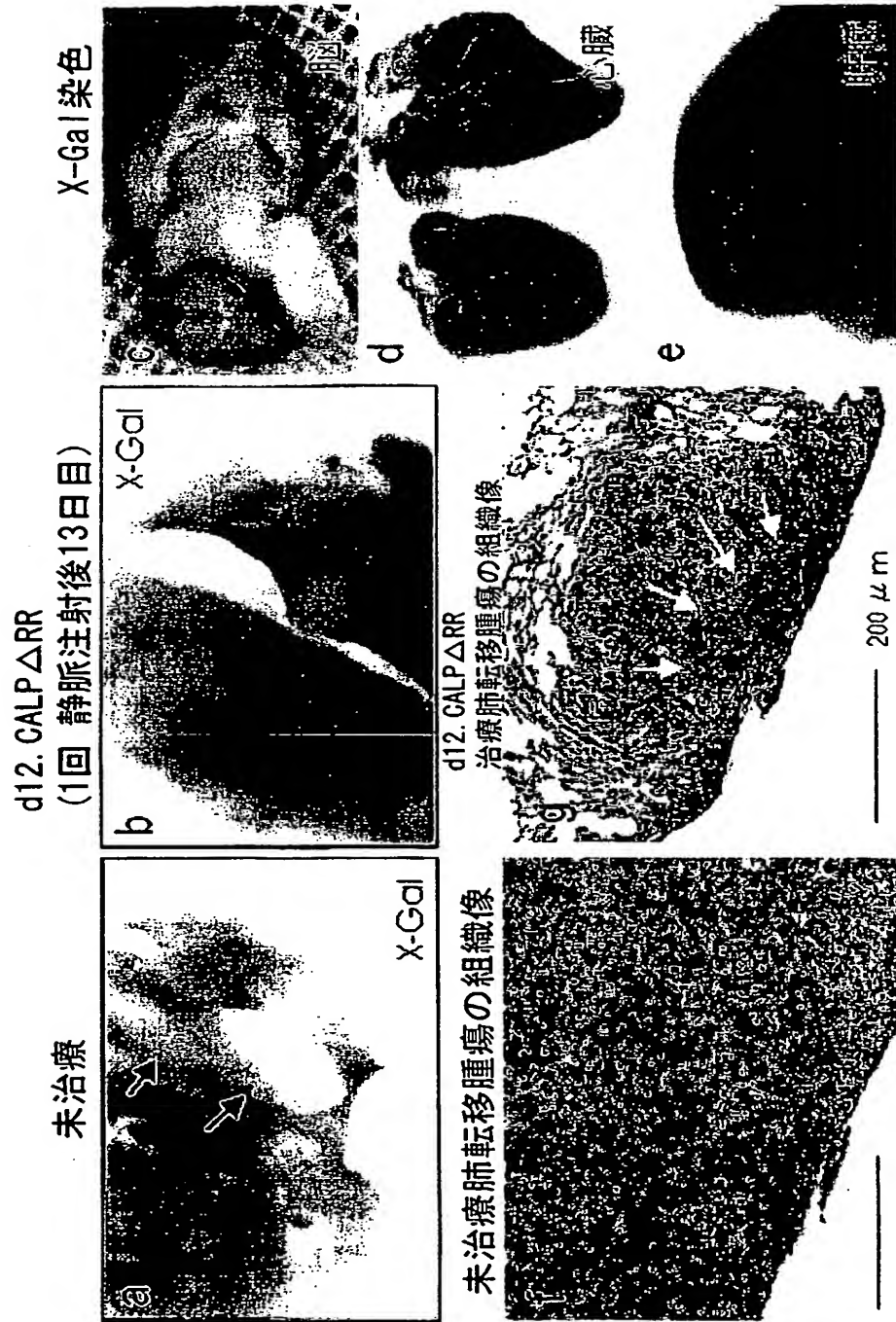
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 7 図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 8 図



BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 9 図

静脈内接種細胞数 5×10^5



未治療

d12. CALP Δ RR
(3回静脈注射)

静脈内接種細胞数 1×10^6



未治療

d12. CALP Δ RR
(3回静脈注射)

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Cell specific express replication vector

<130> B08-01PCT

<140>

<141>

<150> JP P2001-402102

<151> 2001-12-28

<150> JP P2002-255395

<151> 2002-08-30

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 41

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaaacaatga cacaatcagc tcccaatacc aagggcciga c

41

<210> 2

<211> 260

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gaaacaatga cacaatcagc tcccaatacc aagggccatga calcacaagg ggaggggaag 60
 gcagctgagg ttgtgggggg aggtgccccg ccccttggca ggccccatca gccaatggaa 120
 cggccccigga agagaccggt gtgcctccg gagcttcaaa aacatgtgag gaggggaagag 180
 tgtgcagacg gaacttcagc cgtgcctct gtcttcagcg tcagtgccgc cactgcccc 240
 gccagagccc accggccagc 260

<210> 3

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Region consist
 of human calponin gene promoter and its structural
 gene fragment

<400> 3

gaaacaatga cacaatcagc tcccaatacc aagggccatga calcacaagg ggaggggaag 60
 gcagctgagg ttgtgggggg aggtgccccg ccccttggca ggccccatca gccaatggaa 120
 cggccccigga agagaccggt gtgcctccg gagcttcaaa aacatgtgag gaggggaagag 180
 tgtgcagacg gaacttcagc cgtgcctct gtcttcagcg tcagtgccgc cactgcccc 240
 gccagagccc accggccagc atgtctctg ctacattcaa ccgaggccct gccacgggc 300
 tgtcagccga ggtaagaac aaggtagggg tgg 333

<210> 4

<211> 445

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gtgagtgag cgcgcccccg tcccggtac ctccggtga atctggggc ttgcaccgac 60
 cccctcccc gtccccagac ggaatagat ggtcttccc tccatccgt accgacgact 120
 gtccccctt cccccaccc ctccccggca catgtctt cctctcttc ttgaagaaa 180
 gccgaccgc ccttcactcc gtacagagg tgggtgact agcgtctcc tccccgcgg 240

cgccagaagc cagllgcaac cgglllclga aglaalglgc aggatlccll acalcagcic 300
 clclgaglcl cglgallcag ccllgccclcc clclclcccc clllgcccc lccccglccc 360
 acccllaggc gclgggagaa gggaggggagg ggaggicagg ggccclclag agggggccica 420
 cllgllaacc cagccccca lllcag 445

<210> 5

<211> 455

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggatcccatg lcccatcaga gclaaaagcc ccaggaggag aggggggclg glllgcccc 60
 acaaacccll gggallcccg gclccccagc ccllgcccc clclclccagc cagactclal 120
 lgaatcccc clclclclcaa acclggggcc agagaacagl gaagtaggag cagccglaag 180
 lccgggcagg glcclglcca laaaaggcll lccccgggccc ggcclccccgc cggcagcgig 240
 ccccgccccg gcccgclcca clclccaaagc atgcagagaa lgtclcgga gccccggtag 300
 actgclccaa clgggtgcll lccccaaat atggagccig lgtggagica clgggggagc 360
 cgggggaggg gagcggagcc ggcllcccll agcaggagg gggccgagga gcgagccagl 420
 gggggaggcl gacalcacca cggcggcagc cclll 455

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: FPI

<400> 6

gaglgcag acggaaclic agcc

24

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:RP1

<400> 7

gtcgtgccc aacttggggl c

21

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:FP2

<400> 8

cccatcacca tcttccagga

20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:RP2

<400> 9

ttgtcatacc aggaaatgag c

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13683

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/64, C12P21/00, C12Q1/02, A61K48/00, A61P35/00,
43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/64, C12P21/00, C12Q1/02, A61K48/00, A61P35/00,
43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cheon J. et al., Adenovirus-mediated suicide-gene therapy using the herpes simplex virus thymidine kinase gene in cell and animal models of human prostate cancer: changes in tumour cell proliferative activity. BJU Int. 2000 Apr., Vol.85, No.6, pages 759 to 766	1-28,35-36
A	TAKAHASHI K. et al., Transcriptional Targeting of Replication-Competent Herpes Simplex Virus to Proliferating Smooth Muscle Cells. Circulation 2000 Oct., Vol.102, No.18, II-86, 416	1-28,35-36
A	TAKAHASHI K. et al., The 5'-flanking region of the human smooth muscle cell calponin gene contains a cis-acting domain for interaction with a methylated DNA-binding transcription repressor. J.Biochem. (Tokyo), 1996 Jul., Vol.120, No.1, pages 18 to 21	1-28,35-36

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 17 March, 2003 (17.03.03)	Date of mailing of the international search report 08 April, 2003 (08.04.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13683

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAMAMURA H. et al., "Identification of the transcriptional regulatory sequences of human calponin promoter and their use in targeting a conditionally replicating herpes vector to malignant human soft tissue and bone tumors.", Cancer Res. 15 May, 2001 (15.05.01), Vol.61, No.10, p.3969-77	1-28,35-36
A	WO 02/092816 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 21 November, 2002 (21.11.02), & JP 2002-335965 A	1-28,35-36
P,A	Kruger M. et al., Involvement of proteasome alpha-subunit PSMA7 in hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. Mol.Cell.Biol. 2001 Dec., Vol.21, No.24, pages 8357 to 8364	1-28,35-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13683

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 29-34

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 29 to 34 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/64, C12P21/00, C12Q1/02, A61K48/00,
A61P35/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/64, C12P21/00, C12Q1/02, A61K48/00,
A61P35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
BIOSIS/WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Cheon J. et al., Adenovirus-mediated suicide-gene therapy using the herpes simplex virus thymidine kinase gene in cell and animal models of human prostate cancer: changes in tumour cell proliferative activity. BJU Int 2000 Apr, Vol. 85, No. 6, p. 759-766	1-28, 35-36
A	Takahashi K. et al., Transcriptional Targeting of Replication-Competent Herpes Simplex Virus to Proliferating Smooth Muscle Cells. Circulation 2000 Oct, Vol. 102, NO. 18, II-86, 416	1-28, 35-36

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 03. 03

国際調査報告の発送日

08.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Takahashi K et al., The 5'-flanking region of the human smooth muscle cell calponin gene contains a cis-acting domain for interaction with a methylated DNA-binding transcription repressor. J Biochem (Tokyo) 1996 Jul, Vol. 120, No. 1, p. 18-21	1-28, 35-36
A	Yamamura H. et al., 'Identification of the transcriptional regulatory sequences of human calponin promoter and their use in targeting a conditionally replicating herpes vector to malignant human soft tissue and bone tumors.', Cancer Res. 2001 May 15, Vol. 61, No. 10, p. 3969-77	1-28, 35-36
A	WO 02/092816 A1 (科学技術振興事業団) 2002. 11. 21 & JP 2002-335965 A	1-28, 35-36
PA	Kruger M. et al., Involvement of proteasome alpha-subunit PSMA7 in hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. Mol Cell Biol 2001 Dec, Vol. 21, No. 24, p. 8357-8364	1-28, 35-36

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 29-34 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 29-34 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a) (i) 及び PCT 規則 39.1 (iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)